

UFRRJ

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

TESE

**Elaboração de patê de frango contendo ingredientes funcionais e
substituição de sais de cura por nisina**

Flávia De Floriani Pozza Rebello

2012



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

**ELABORAÇÃO DE PATÊ DE FRANGO CONTENDO
INGREDIENTES FUNCIONAIS E SUBSTITUIÇÃO DE SAIS
DE CURA POR NISINA**

FLÁVIA DE FLORIANI POZZA REBELLO

Sob a Orientação da professora

Dra. Arlene Gaspar

e Co-Orientação da professora

Dra. Rosa Helena Luchese, PhD

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.

Seropédica, RJ
Julho de 2012

664.93

R291e

T

Rebello, Flávia De Floriani Pozza, 1973-

Elaboração de patê de frango contendo ingredientes funcionais e substituição de sais de cura por nisina / Flávia De Floriani Pozza Rebello - 2012.

130 f.: il.

Orientador: Arlene Gaspar.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 98-122.

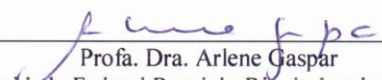
1. Carne de ave - Microbiologia - Teses. 2. Bacteriocinas - Teses. 3. Nisina - Teses. 4. Tecnologia de alimentos - Teses. I. Gaspar, Arlene, 1956-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

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


FLÁVIA DE FLORIANI POZZA REBELLO

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.

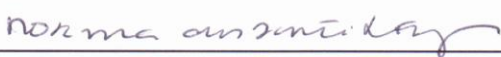
TESE APROVADA EM 16/07/2012



Prof. Dra. Arlene Gaspar
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)
(Orientadora)



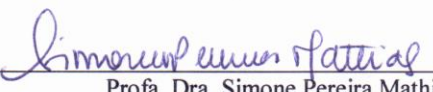
Dra. Sandra Helena Inoue Oda
UNILEVER Alimentos



Dra. Norma dos Santos Lázaro
FIOCRUZ – Instituto Oswaldo Cruz



Prof. Dr. Victor Maximiliano Reis Tebaldi
UNIFOA- Centro Universitário de Volta Redonda



Prof. Dra. Simone Pereira Mathias
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos alunos e alunas do antigo Curso Técnico em Agroindústria (concomitante e subsequente) do Instituto Federal do Sul de Minas Gerais - Campus Inconfidentes - que motivaram-me a desenvolver este trabalho.

“Se estás verdadeiramente comprometido com tua meta, o universo inteiro conspira a teu favor para que apareçam os instrumentos e pessoas que te permitirão logr -lo.”

Goethe

AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as bênçãos derramadas em minha vida, e por ter me proporcionado a graça de realizar este trabalho.

Ao meu pai Antônio João de Menezes Rebello (*in memoriam*) que me ensinou a enfrentar todos os desafios com força e coragem e jamais desistir de meus objetivos.

À minha mãe Izabel Lígia Pozza Rebello e meus irmãos Fernando De Floriani Pozza Rebello e Carlos Eduardo Pozza Rebello pela compreensão, incentivo, força e amor incondicionais em todos os momentos de minha vida.

À minha Orientadora profa Dra Arlene Gaspar e minha Co-orientadora profa Dra Rosa Helena Luchese que além do auxílio técnico, me incentivou com carinho nos momentos mais difíceis.

À todos os membros da banca, pela participação e contribuição significativa para a melhoria deste.

Ao Srº Everton Chaves, representante da Duas Rodas do Brasil, pela doação dos condimentos utilizados nas formulações dos patês.

Ao Srº Ivano De Filippis (INCQS-FIOCRUZ) pela doação da cepa do *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397).

Aos técnicos e amigos do Laboratório de Análise de Alimentos e Bebidas (LAAB): Luciana, Izabella, Elizângela, Renan e em especial ao Juarez Vicente e à Tatiana Moura, que muito me auxiliaram na execução das análises físico-químicas. Aos técnicos e amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Edinar Rodrigues (Dina), Leandro Cappato (Lelê), Cristiane Nogueira Clemar Tavares e Edlene Prudêncio pelos ensinamentos, auxílio, carinho e acolhida.

Ao mestrando André Fioravante Guerra pela ajuda com as fotos das lâminas de Microbiologia.

Ao técnico da planta de Processamento de Carnes, Srº Edio Mariano pelo auxílio e dedicação.

À profa Dra Sandra Gregório pela permissão do uso do Laboratório de Análises Sensoriais do Departamento de Tecnologia de Alimentos e ao técnico responsável “Fernandão”.

À Dra Rosemar Antoniassi da Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA) pela acolhida e todo auxílio prestado na condução das análises de oxidação lipídica (TBARS).

À amiga Dra Djalva Maria da Nóbrega Santana pelo auxílio na interpretação dos resultados do perfil em ácidos graxos e TBARS.

À todos os voluntários que participaram dos testes sensoriais pela valiosíssima ajuda.

À Dra Janaina Ribeiro da Embrapa Agropecuária pelo auxílio com as análises estatísticas.

Agradecimento especial aos amigos e amigas: Geraldo dos Santos Oliveira, Valéria França, Kamila de Oliveira do Nascimento, Marisa Mendes, Cristiane Hess de Azevedo Meleiro, Ingrid da Mata, Izabel Souza (Bebel), Jair Melo, Elizete Amorim, Fernanda Fernandes, Gislene Bremmer, Elizabeth Lemos Benício, Vanessa de Magalhães Ferreira, Ticiane França, Rosana Colatino e Regiane Ribeiro, pela amizade, incentivo, força e carinho durante as etapas mais críticas, proporcionando-me momentos muito felizes.

Aos meus cães Cacau, Thor e Belinha, pela companhia e carinho incondicionais.

Aos amigos do IFSul de Minas Gerais, Campus Inconfidentes: Sheila Guidi Pistelli, Rafael Tenório, Rafael Luiz Rafaelli e Silvana Cândido pelo incentivo e amizade.

À todos que, de forma direta ou indireta ajudaram-me a realizar este grande objetivo.

RESUMO GERAL

REBELLO, Flávia de Floriani Pozza. **Elaboração de patê de frango contendo ingredientes funcionais e substituição de sais de cura por nisina**. 2012, 130p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O patê é um produto cárneo bastante susceptível à contaminação microbiana, principalmente por anaeróbios, em razão de sua forma de acondicionamento, composição química e alta atividade de água. Os sais de cura (nitrato e nitrito de sódio) são utilizados em produtos cárneos para inibir o crescimento destes micro-organismos. Porém, este pode ser potencialmente carcinogênico, indo contra os anseios de consumidores que buscam cada vez mais consumir alimentos benéficos à saúde. A nisina é um antimicrobiano natural considerado seguro, utilizada em diversos países. O objetivo da presente pesquisa foi elaborar formulações de patê de frango, substituindo os sais de cura por nisina sendo 2 controles: FC (sem adição de conservadores) e SC (com adição de 150 mg/kg de sal de cura) e 3 formulações contendo nisina: F1, F3 e F5 (contendo 100, 300 e 500mg/kg de nisina, respectivamente), além de substituir a gordura animal por azeite de oliva. Amostras de patês comerciais embalados em vidro (CV), bisnaga (CB) e lata (CL) também foram utilizadas para efeito de comparação. Foram realizadas análises físico-químicas (composição química, teor de cloretos e minerais, pH, Aa, perfil em ácidos graxos e TBARS), microbiológicas e sensoriais. Os resultados revelaram que o pH manteve-se abaixo de 6,0 ao longo do tempo em todas as formulações, com valores entre 5,37 e 5,84, dentro da faixa de atuação da nisina. Os patês possuíam alta atividade de água (Aa), variando entre 0,971 (F5) e 0,991 (CL). As análises de composição química mostraram que tanto as formulações teste quanto as amostras comerciais estavam de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação para umidade, obtendo-se valores entre 63,91 a 65,31% (< 70%), proteína entre 14,56 e 15,94% (> 8%) e lipídeos entre 13,43 e 14,68% (<32%). O teor de cloretos e íons sódio aumentaram proporcionalmente à adição de nisina. Os baixos valores de TBARS (entre 0,054 e 0,334mg/kg de malonaldeído) indicaram que as formulações apresentaram boa estabilidade à oxidação lipídica durante 180 dias de armazenamento, sendo confirmado pelo teste sensorial para verificação de “*off flavour*”. O perfil em ácidos graxos mostrou que a substituição do toucinho pelo azeite tornou as formulações mais saudáveis pelo incremento em ácidos graxos monoinsaturados e redução dos saturados. A adição de 300 e 500mg/kg de nisina dobraram a vida útil do produto (aproximadamente 180 dias) quando comparada à adição de 150mg/kg de sal de cura (90 dias) nos patês mantidos sob refrigeração (8±2°C). O teste em temperatura abusiva de 36°C mostrou que após 10 dias de incubação, as amostras F3 e F5 mantiveram-se inalteradas, enquanto SC apresentou contaminação por clostrídios aos 7 dias. O *Challenge testing* com inoculação do *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397) mostrou que SC apresentou contaminação visível aos 7 dias de incubação à 30°C, enquanto F3 e F5 mantiveram-se inalteradas ao final de 28 dias, indicando que houve efeito bactericida da nisina à partir da adição de 300 mg/kg. Com relação às análises sensoriais, verificou-se que as formulações teste apresentaram boa aceitação e intenção de compra.

Palavras-chave: carnes, bacteriocinas, nitrato e nitrito de sódio

GENERAL ABSTRACT

REBELLO, Flávia De Floriani Pozza. **Preparation of chicken pâté containing functional ingredients and substitution the curing salts by nisin**. 2012, 130p. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The pâté is a very susceptible meaty product to microbial contamination, especially by anaerobic microorganisms, because of its packaging shape, chemical composition and high water activity. The curing salts (sodium nitrite and nitrate) are used in meat products for inhibiting the growth of these micro-organisms. However, these ingredients be potentially carcinogenic, against the wishes of consumers who are increasingly seeking to consume foods that provide health benefits. Nisin is a natural antimicrobial considered safe, used in several countries. The objective of this research was to develop formulations of chicken pâté, replacing the curing salts by nisin, with two controls: FC (without conservatives) and SC (with addition of 150 mg/kg of curing salt) and three formulations containing nisin: F1, F3 and F5 (containing 100, 300 and 500 mg/kg nisin, respectively) and replace the fat by olive oil. Commercial samples packed in glass pâtés (CV) tube (CB) and tin (CL) were also used for comparison. Physico-chemical analysis were carried out (chemical composition, chloride content and minerals, pH, Aw, fatty acids profile and TBARS), microbiological and sensory analysis. The results showed that the pH remained below 6.0 during the time (180 days) in all formulations, values between 5.37 and 5.84, in the range of action of nisin. The pâtés had high water activity (Aw), ranging from 0.971 (F5) and 0.991 (CL). The chemical analyzes showed that all formulations and testing commercial samples were in accordance with legislation for moisture, yielding values ranging from 63.91 to 65.31% (<70%), protein from 14, 56 and 15.94% (> 8%) and lipids between 13.43 and 14.68% (<32%). The chloride and sodium ions increased proportionally to the addition of nisin. The low levels of TBARS (between 0.054 and 0.334 mg / kg malonaldehyde) indicated that the formulations showed good stability to lipid oxidation during 180 days of storage, being confirmed by the sensory test to check for "off flavor". The fatty acid (FA) profile in the formulations with replacement of fat by olive oil had higher levels of monounsaturated FA and lower levels of saturated FA. Addition of 300 to 500mg/Kg nisin doubled service life of the product (approximately 180 days) as compared to addition of 150mg/kg of curing salt (90 days) in pâtés refrigerated ($8 \pm 2^\circ \text{C}$). Test abusive temperature of 36°C showed that after 10 days of incubation, the F3 and F5 samples remained unchanged while SC contamination by clostridia on day 7. The Challenge testing with inoculation of *Clostridium botulinum* type A (ATCC 19397) showed that SC had visible contamination at 7 days of incubation at 30°C , while F3 and F5 remained unchanged after 28 days, indicating that there was bactericidal effect of nisin from the addition of 300 mg/kg. Regarding to sensory analysis the tested formulations showed good acceptance and purchase intention.

Keywords: meats, bacteriocins, sodium nitrite and nitrate

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos e condições ótimas das toxinas botulínicas	13
Tabela 2. Casos de botulismo no mundo (adaptada)	15
Tabela 3. Alimentos envolvidos em casos de botulismo	17
Tabela 4. Origem dos alimentos envolvidos em casos de botulismo	17
Tabela 5. Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos.....	27
Tabela 6. Países que permitem o uso de nisina como bioconservador	32
Tabela 7. Formulações desenvolvidas para os patês.....	37
Tabela 8. Médias*seguidas pelos erros padrão dos teores de umidade, cinzas, proteína, lipídios e carboidratos das amostras teste e comerciais	48
Tabela 9. Médias*seguidas pelos erros padrão do valor calórico das amostras teste e comerciais.....	49
Tabela 10. Médias* seguidas pelos erros padrão dos teores de cloretos e minerais Na ⁺ , K ⁺ e Ca ⁺⁺ das amostras teste e comerciais	53
Tabela 11. Médias* seguidas pelos erros padrão dos teores de pH das amostras teste	54
Tabela 12. Médias* seguidas pelos erros padrão de Atividade de água (Aa) das amostras teste e comerciais	56
Tabela 13. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra FC nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento	57
Tabela 14. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra SC nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento	58
Tabela 15. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra F1 nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento	59
Tabela 16. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra F3 nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento	60
Tabela 17. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra F5 nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento	61
Tabela 18. Resultado do perfil em ácidos graxos das amostras CV, CB e CL	62
Tabela 19. Médias* seguidas pelos erros padrão de TBARS em mg/kg de malonaldeído das amostras teste ao longo dos dias de estocagem	64
Tabela 20. Resultados para as análises de clostrídios sulfito redutores em meio SPS ao longo do período de armazenamento.....	68
Tabela 21. Resultados do <i>Challenge testing</i> com <i>Clostridium botulinum</i> ao longo do tempo	80
Tabela 22. Quantidade e custos para elaboração das formulações de patê de frango.....	84
Tabela 23. Médias* das avaliações p/ o teste de aceitação em escala hedônica de 9 pontos..	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do <i>Clostridium botulinum</i>	11
Figura 2. Morfologia dos esporos de <i>Clostridium botulinum</i> em aumento de 2000x	12
Figura 3. Função neurotransmissora normal	14
Figura 4. Mecanismo de ação da toxina botulínica	14
Figura 5. Casos suspeitos e confirmados de botulismo no Brasil entre 1999 e 2011.....	16
Figura 6. Casos de botulismo por regiões do Brasil	16
Figura 7. Mecanismo de ação de algumas bacteriocinas	28
Figura 8. Modificações pós translação na formação da nisina.....	29
Figura 9. Aminoácidos presentes na estrutura primária da nisina.....	30
Figura 10. Fluxograma do processo de produção do patê de frango	38
Figura 11. Etapas de processamento do patê.....	38
Figura 12. Equipamento para análise de TBARS.....	41
Figura 13. Teste de comparação múltipla para verificação de “off flavour”... ..	65
Figura 14. Análise qualitativa de clostrídio sulfito redutor em meio SPS e selo vaspar.	67
Figura 15. Esporos de <i>Clostridium sp</i> encontrados em patê FC (sem conservadores) em meio SPS.....	68
Figura 16. Esporos de <i>Clostridium sp</i> encontrados em patê SC (adicionado de 150 mg/kg de sal de cura) em meio SPS.....	69
Figura 17. Esporos de <i>Clostridium sp</i> encontrados em patê F1 e F3 (adicionados de 100 e 300 mg/kg de nisina respectivamente) em meio SPS.....	69
Figura 18. Teste qualitativo de incubação para as amostras FC (controle sem conservadores), SC (com 150mg/kg de sal de cura), F1 (com 100mg/kg de nisina), F3 (com 300mg/kg de nisina) e F5 (com 500mg/kg de nisina).....	70
Figura 19. <i>Bacillus sp</i> e seus esporos encontrados em patê FC (sem conservadores) estriado em ágar extrato de fígado em pó mantido em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose.....	71
Figura 20. <i>Bacillus sp</i> e seus esporos encontrados em patê SC (contendo 150 mg/kg de sal de cura) estriado em ágar extrato de fígado em pó mantido em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose.	71
Figura 21. <i>Clostridium sp</i> e seus esporos encontrados em patê FC (sem conservadores) estriado em ágar extrato de fígado em pó mantido em BOD à 36°C/4 dias em anaerobiose. ...	72
Figura 22. <i>Clostridium sp</i> e seus esporos encontrados em patê SC (contendo 150 mg/kg de sal de cura) estriado em ágar extrato de fígado em pó mantido em BOD à 36°C/4 dias em anaerobiose.....	72
Figura 23. <i>Bacillus sp</i> e seus esporos encontrados em patê F1 (adicionado de 100mg/kg de nisina) estriado em ágar extrato de fígado em pó em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose.....	73
Figura 24. <i>Clostridium sp</i> e seus esporos encontrados em patê F1 (adicionado de 100mg/kg) estriado em ágar extrato de fígado em pó em BOD à 36°C/4 dias em anaerobiose.	73
Figura 25. Teste qualitativo de incubação em caldo PBC com as amostras FC (controle sem conservadores), SC (com 150mg/kg de sal de cura), F1 (com 100mg/kg de nisina), F3 (com 300mg/kg de nisina) e F5 (com 500mg/kg de nisina)	74
Figura 26. <i>Bacillus sp</i> e seus esporos encontrados em patê controle FC (sem conservadores) estriado em ágar nutriente manganês (ANMn) mantido em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose	74

Figura 27. <i>Bacillus sp</i> e seus esporos encontrados em patê SC (contendo 150 mg/kg de sal de cura) estriado em ágar nutriente manganês (ANMn) mantido em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose.....	75
Figura 28. <i>Bacillus sp</i> e seus esporos encontrados em patê F1(contendo 100mg/kg) estriado em ágar nutriente manganês (ANMn) em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose.	75
Figura 29. Esporos de <i>Clostridium sp</i> encontrados em pimenta branca de marca comercial não estéril, em meio ágar caldo de fígado e selo vaspar.....	76
Figura 30a. Comparação visual entre os potes de patê C (controle sem conservadores, sem inoculação) e Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397)).	77
Figura 30b. Comparação visual entre os potes de patê C (controle sem conservadores, sem inoculação) e Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397 - vista frontal))......	77
Figura 30c. Comparação visual entre os potes de patê Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397)) e F1 (com adição de 100mg/Kg de nisina, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397))......	78
Figura 30d. Comparação visual entre os potes de patê Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397)) e F3 (com adição de 300mg/kg de nisina, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397))......	78
Figura 30e. Comparação visual entre os potes de patê Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397)) e F5 (com adição de 500mg/kg de nisina, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397))......	79
Figura 30f. Comparação visual entre os potes de patê SC (com adição de 150mg/kg de sal de cura, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397)) e F5 (com adição de 500mg/kg de nisina, inoculado com 100 esporos/g de <i>Clostridium botulinum</i> tipo A (ATCC 19397))......	79
Figura 31. Sexo dos participantes.....	86
Figura 32. Idade dos participantes.....	86
Figura 33. Grau de escolaridade dos participantes.....	87
Figura 34. Tipos de aditivos preferidos.....	87
Figura 35. Preferência por tipo de embalagem.....	88
Figura 36. Conhecimento do termo “alimento funcional”.....	89
Figura 37. Substituição de refeições completas por lanches rápidos.....	89
Figura 38. Doenças mais relatadas pelos participantes.....	90
Figura 39. Aceitabilidade global dos patês teste e comerciais (escala hedônica de 9 pontos). 92	
Figura 40. Intenção de compra para a amostra teste SC.....	93
Figura 41. Intenção de compra para a amostra teste F3.....	94
Figura 42. Intenção de compra para a amostra comercial CB.....	94
Figura 43. Intenção de compra para a amostra comercial CV.....	95

LISTA DE SIGLAS

mg/kg – miligramas por kilograma

UI/g – Unidades Internacionais por grama

pH – potencial de hidrogênio

% - porcentagem

ATCC – American Type Culture Collection (Coleção Americana de Tipos de Culturas)

°C – graus Celsius

GRAS – Generally Regarded as Safe (Reconhecida geralmente como segura)

L – litro

mL – mililitro

g – grama

Na⁺ - sódio

K⁺ - potássio

Ca⁺⁺ - cálcio

µg - micrograma

KDa – (KiloDáton) medida de peptídeo e proteína

EDTA – EthyleneDiamine Tetraacetic Acid (ácido etilenodiamino tetra acético)

ATP – Adenosina Trifosfato

TM – Trade mark (produto cuja marca não foi registrada oriundo de marcas registradas)

S/A – Sociedade Anônima

® - Marca Registrada

LTDA – Sociedade limitada

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

PA – Pró-Análise (grau analítico)

UR – Umidade Relativa

SISVAR – Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados

Kcal - Kilocalorias

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

APHA – American Public Health Association (Associação americana de saúde pública)

BOD – incubadora para determinação de Demanda Bioquímica de Oxigênio

AOAC – Association of Official Analytical Chemists (Associação oficial dos analistas químicos)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral.....	2
1.2 Objetivos Específicos.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Origem do Patê	4
2.2 Ingredientes e Aditivos Permitidos pela Legislação para Uso em Patê	4
2.2.1 Sais de Cura (nitrito e/ou nitrato de sódio).....	5
2.2.2 Açúcares	6
2.2.3 Estabilizantes	6
2.2.4 Antioxidantes	7
2.2.5 Água.	7
2.2.6 Condimentos	7
2.3 Micro-organismos Indicadores de Contaminação nos Alimentos	8
2.3.1 Coliformes totais	8
2.3.2 Coliformes termotolerantes	8
2.3.3 Estafilococos coagulase positivo	9
2.3.4 <i>Salmonella</i> spp.	9
2.3.5 Bactérias lácticas	9
2.3.6 <i>Clostridium botulinum</i> (clostrídios sulfito redutores).....	10
2.4 Novo Perfil do Consumidor - Dieta Saudável	18
2.5 Ingredientes de Elaboração do Patê dentro do Contexto de Alimento Saudável.....	19
2.5.1 Carne de peito de frango.....	19
2.5.2 Sal comum x sal light	20
2.5.3 Linhaça	21
2.5.4 Vinho tinto	21
2.5.5 Azeite de oliva.	22
2.5.6 Soja.....	23
2.5.7 Iogurte.....	23
2.6 Fatores que Influenciam diretamente na Qualidade do Patê c/ Ingredientes Funcionais ...	24
2.6.1 Composição química	24
2.6.2 Oxidação lipídica	24
2.6.3 Tratamento térmico.....	26
2.6.7 Uso de aditivos.	26
2.7 Bacteriocinas (Antimicrobianos Naturais)	26
2.7.1 Nisina.....	28
2.8 Métodos Sensoriais	34

3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Origem das Matérias Primas, Condimentos e Aditivos	36
3.2 Formulações Desenvolvidas para os Patês Teste.....	36
3.2.1 Elaboração dos patês	37
3.3 Análises Físico-Químicas	39
3.3.1 Composição química	39
3.3.2 Teor de cloretos e minerais (Na ⁺ , K ⁺ e Ca ⁺⁺)	39
3.3.3 pH.....	39
3.3.4 Atividade de água (Aa).....	39
3.3.5 Perfil em ácidos graxos	39
3.3.6 Oxidação lipídica (Substâncias Reativas ao Ácido 2- Tiobarbitúrico: TBARS)	40
3.4 Análises Microbiológicas	41
3.4.1 Determinação da vida útil dos patês.....	41
3.4.2 Teste microbiológico qualitativo em temperatura abusiva de 36°C e 55°C	44
3.4.3 <i>Challenge testing</i> com <i>Clostridium botulinum</i> em temperatura abusiva de 30°C	44
3.5 Análises Sensoriais.....	45
3.5.1 Teste de comparação múltipla para verificação de “ <i>off flavour</i> ”.....	46
3.5.2 Teste de aceitação em escala hedônica de 9 Pontos.....	47
3.5.3 Teste de intenção de compra	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Resultados das Análises Físico-Químicas	48
4.1.1 Composição química	48
4.1.2 Teor de cloretos e minerais (Na ⁺ , K ⁺ e Ca ⁺⁺)	53
4.1.3 pH.....	54
4.1.4 Atividade de água (Aa).....	56
4.1.5 Perfil em ácidos graxos	57
4.1.6 Oxidação lipídica (Substâncias Reativas ao Ácido 2- Tiobarbitúrico: TBARS)	63
4.2 Resultados das Análises Microbiológicas	66
4.2.1 Determinação da vida útil dos patês.....	66
4.2.2 Teste microbiológico qualitativo em temperatura abusiva de 36 e 55°C	69
4.2.3 <i>Challenge testing</i> com <i>Clostridium botulinum</i> em temperatura abusiva de 30°C	76
4.3 Resultados das Análises Sensoriais.....	85
4.3.1 Estudo do perfil dos consumidores	85
4.3.2 Teste de aceitabilidade em escala hedônica de 9 pontos	92
4.3.3 Teste de intenção de compra.....	93
5 CONCLUSÕES	96
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	97
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ANEXO A - Cadastro de Consumidores para Análise Sensorial de Alimentos	123
ANEXO B - Termo de Responsabilidade	127
ANEXO C - Ficha para Teste de Comparação Múltipla para Verificação de “ <i>off flavour</i> ” ..	128
ANEXO D - Ficha para Teste de Aceitação em Escala Hedônica de 9 Pontos	129
ANEXO E – Ficha para Teste de Intenção de Compra.....	130

1 INTRODUÇÃO

O patê é um produto cárneo bastante consumido, em razão de seu baixo custo e praticidade. Contudo, por conter alta umidade, alto teor de proteínas e lipídios e pH acima de 4,5, apresenta riscos de contaminação, principalmente por micro-organismos anaeróbios, como o *Clostridium botulinum*, além da susceptibilidade à oxidação lipídica. Podem ser comercializados sob refrigeração e à temperatura ambiente, de modo que os refrigerados tornam-se ainda mais vulneráveis à contaminação microbiana, uma vez que a cadeia de frio no Brasil é extremamente falha, o que possibilita oscilações de temperatura, desde a saída do produto da indústria até a mesa do consumidor. Assim, é necessário o uso de conservadores específicos que previnam sua contaminação de forma a inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos.

Os sais de nitrato e nitrito de sódio conhecidos como sais de cura são largamente utilizados na indústria de carnes como conservadores, cujo micro-organismo alvo de inibição é o *Clostridium botulinum*. Além disso, são responsáveis pela coloração rósea característica de produtos curados. Porém, quando adicionados em concentrações superiores à preconizada pela legislação (150mg/kg), tornam-se potencialmente carcinogênicos em razão da formação de nitrosaminas. Por esta razão, há uma crescente preocupação em substituir ou reduzir seu uso por outros conservadores que não ofereçam riscos à saúde.

Atualmente, os consumidores estão cada vez mais preocupados em consumir alimentos mais saudáveis, que promovam uma melhoria na qualidade de vida. Neste contexto, os aditivos sintéticos, bem como o excesso de gorduras saturadas, trans e íons sódio são cada vez mais evitados por consumidores mais conscientes de seus efeitos negativos.

O uso de antimicrobianos naturais vem a atender a estas expectativas, uma vez que não produzem efeitos nocivos ao organismo, sendo sintetizados por micro-organismos responsáveis por processos fermentativos naturais em produtos lácteos e carnes. Estes antimicrobianos podem ser utilizados sob diversas formas: pela síntese no alimento através de culturas *starters* adicionadas ou preexistentes no mesmo, pelo uso direto na forma purificada em formulações, por imersão ou aspersão sobre a superfície dos alimentos ou até mesmo como revestimento em embalagens primárias.

A nisina é um antimicrobiano natural considerado seguro para consumo (Generally Recognized as Safe - GRAS) e vem sendo utilizada em diversos países, inclusive o Brasil como conservador em produtos lácteos, principalmente em queijos. Sua utilização em produtos cárneos em substituição ao sal de cura ainda é controverso, uma vez que são requeridas doses mais elevadas para obtenção de um resultado satisfatório. Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com a utilização da nisina em combinação com os sais de cura (RAYMAN et al. (1981); TAYLOR et al. (1985), a fim de reduzir a concentração destes e evitar a formação de nitrosaminas. Até o momento, a legislação brasileira só reconhece o uso da nisina como conservador quando utilizada na superfície externa de todos os tipos de salsichas em solução de 200mg/kg (0,02%) (BRASIL, 1996). A legislação internacional permite sua utilização em salsichas e mortadela tipo Bolonha principalmente para inibição de *Listeria monocytogenes*, bactérias ácidos lácticas e *Brochotrix thermosphacta*, não havendo legislação para micro-organismos esporogênicos como o *Clostridium botulinum*. O uso da

nisina ocorre em aproximadamente 46 países (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2004), principalmente por apresentar a vantagem de não apresentar mecanismo de resistência (XIE et al., 2004). Embora várias bacteriocinas com potencial de emprego em alimentos já terem sido purificadas e caracterizadas, a nisina, e em menor extensão a pediocina PA-1, são as únicas bacteriocinas produzidas em escala comercial (COTTER et al., 2005).

Há portanto, a necessidade de estudos complementares com o uso da nisina em substituição total aos sais de cura, visando a inibição e/ou eliminação de *Clostridium botulinum* e seus esporos. Porém, além do efeito conservador, os sais de cura desempenham importante papel na formação de coloração rósea característica de produtos curados. Assim, sua total retirada poderia causar um impacto visual negativo ao consumidor. O emprego de corantes naturais como o carmin cochonilha podem vir a auxiliar na manutenção da coloração destes produtos.

Logo, a presente pesquisa pretende determinar a concentração necessária para garantir a ação bactericida da nisina sobre o *Clostridium botulinum* tipo A e seus esporos em patê de frango, partindo de dosagens de nisina mais elevadas que a preconizada pela legislação para produtos lácteos e salsicha (máx de 12,5mg/kg), além de tornar a formulação de patê mais saudável através da redução de gorduras saturadas e introdução de compostos funcionais como o azeite de oliva extra virgem.

1.1 Objetivo Geral

Elaborar diferentes formulações de patês de frango, substituindo integralmente os sais de cura por bacteriocina (nisina comercial - Nisaplin™) e avaliar os efeitos desta substituição sobre a qualidade, sanidade, funcionalidade e aceitabilidade do produto em comparação aos produtos disponíveis no mercado.

1.2 Objetivos Específicos

- 1.2.1 Elaborar cinco formulações de patês de frango, sendo duas formulações controle e três formulações contendo diferentes concentrações de nisina;
- 1.2.2 Substituir a gordura animal tradicionalmente utilizada como fonte lipídica nas formulações de patê por iogurte natural e azeite de oliva, a fim de tornar as formulações mais saudáveis;
- 1.2.3 Determinar a composição química (umidade, cinzas, proteína, lipídios e carboidratos totais) bem como o teor de cloretos e minerais (Na^+ , K^+ e Ca^{++}) e a atividade de água (Aa), das formulações teste e de marcas comerciais de patê de frango;
- 1.2.4 Determinar o pH ao longo do período de vida útil das diferentes formulações teste;
- 1.2.5 Determinar o perfil em ácidos graxos e seus teores aos 1, 90 e 180 dias de armazenamento, comparando-as aos produtos comerciais CV, CB e CL.
- 1.2.6 Verificar a taxa de oxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) das formulações teste aos 1, 60, 120 e 180 dias de

armazenamento, comparando-se os resultados da formulação F3 com o teste sensorial de comparação múltipla;

- 1.2.7 Determinar o prazo de vida útil dos patês desenvolvidos, mantidos sob refrigeração à $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75\pm 5\%$ por até 180 dias, avaliando o efeito antimicrobiano da nisina sobre o crescimento de: Clostrídios sulfito redutores; *Salmonella* spp; Estafilococos coagulase positivo; Coliformes totais e termotolerantes; bolores e leveduras; micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrófilos e bactérias lácticas;
- 1.2.8 Realizar teste microbiológico qualitativo das formulações em temperatura abusiva de 36°C e 55°C durante 10 e 7 dias respectivamente;
- 1.2.9 Avaliar a efetiva ação bactericida da nisina sobre o *Clostridium botulinum* tipo A, ATCC 19397 nos dias 7, 10, 14, 21 e 28 de armazenamento em temperatura abusiva de 30°C (*Challenge testing*);
- 1.2.10 Determinar a aceitabilidade utilizando escala hedônica de 9 pontos e a intenção de compra das formulações contendo nisina em comparação às formulações contendo sal de cura, por meio de testes sensoriais realizados por provadores não treinados, selecionados aleatoriamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem do Patê

O patê é um produto cuja origem é bastante antiga, sendo difícil precisar de onde tenha surgido. Alguns estudos indicam que os faraós já consumiam fígado amassado de patos que migravam no inverno para as margens do rio Nilo. Após alguns séculos, este hábito foi levado ao Sudoeste da França, onde até hoje provém os melhores patês de “foie gras” do mundo (ROITMAN, 2008).

Relata-se que, em 1780, o Marquês de Contades, em uma festa em seu castelo em Alsace, ordenou ao seu cozinheiro, Jean Pierre Clause, que criasse um prato especial para seus convidados. Como havia uma enorme criação de gansos no palácio, Clause imaginou uma massa de pão onde pudesse arrumar os fígados destes temperados, levando-os para assar, até que a casca do pão estivesse dourada. Denominou o prato então de “Foie en croûte” (fígado na crosta), porém tornou-se conhecido como Patê de Contades. Nove anos depois, Clause se associou a Nicolas François Doyen, ex-cozinheiro de um magistrado do parlamento de Bordeaux, que acrescentou à receita original de Clause, trufas negras da região de Perigord para tornar o prato mais requintado (NEVES, 2010).

Esta foi a primeira modificação da receita original. Aos poucos, o patê foi se democratizando em vários lugares do mundo, substituindo o fígado de gansos por fígado de galinha, presunto, carne e até mesmo alguns tipos de queijos. Outros ingredientes como maionese e gordura animal também foram adicionados a fim de se obter sabor e a textura cremosa, além da adição de diversas especiarias e condimentos (NEVES, 2010).

2.2 Ingredientes e Aditivos Permitidos pela Legislação para Uso em Patê

Segundo Brasil (2000) ‘entende-se por pasta ou patê, seguido das especificações que couberem, o produto cárneo industrializado obtido à partir de carnes e/ou produtos cárneos e/ou miúdos comestíveis, das diferentes espécies de animais de açougue, transformados em pasta, adicionado de ingredientes e submetido a um processo térmico adequado’.

Aos ‘ingredientes obrigatórios na composição de patês incluem-se: carne de espécies de animais de açougue, sal e nitrito e/ ou nitrato de sódio ou potássio em forma de salmoura. Dentre os ingredientes opcionais estão: proteínas de origem animal e/ ou vegetal, açúcares, condimentos, aromas e especiarias e aditivos intencionais. Permite-se a adição de proteínas não cárneas na forma agregada de 2%’ (BRASIL, 2000).

De acordo com Schmelzer – Nagel (1999), há basicamente duas classificações para patê: patê cremoso, que é constituído de uma mistura de carne crua e cozida e patê pastoso, constituído somente de carne cozida.

Os coadjuvantes e aditivos utilizados pela indústria de alimentos (exceto os condimentos e especiarias ‘*in natura*’) são aprovados previamente para uso pelo órgão do Ministério da Saúde, sendo em seguida registrados no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz, do Ministério da Saúde, ou no Departamento de Inspeção dos Produtos de Origem Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (DIPOA/ MA). A mistura de aditivos é supervisionada pelas Secretarias de Saúde, nos produtos finais, por delegação do Ministério correspondente e pelo DIPOA/ MA nos estabelecimentos sob sua jurisdição (BRASIL, 2000).

2.2.1 Sais de cura (nitrato e/ou nitrito de sódio)

Os sais de nitrato e nitrito de sódio são largamente empregados em indústrias processadoras de carnes como conservadores, visando a inibição do crescimento de *Clostridium botulinum*, produção de esporos e toxina botulínica em meio ácido (ROÇA, 2005).

O efeito antimicrobiano do nitrito não se baseia no impedimento da transformação do esporo em célula vegetativa (responsável pela produção da toxina) e sim na inibição da divisão destas células vegetativas que formariam colônias (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

A ação do nitrito limita-se somente às bactérias anaeróbias. Para os micro-organismos aeróbios, representam apenas uma fonte de nitrogênio, não sendo eficazes portanto na prevenção do crescimento de fungos filamentosos e leveduras (ORDÓÑES et al., 2005).

Os sais de cura auxiliam também na inibição da oxidação lipídica. A carne é rica no pigmento mioglobina, maior responsável pela coloração vermelha das carnes. Porém, a mioglobina contém íon ferro, que na forma oxidada (Fe^{+++}) acelera as reações de oxidação.

Ao se adicionar nitrito à carne, este se liga à mioglobina, mantendo o íon ferro na forma reduzida (Fe^{++}), retardando assim estas reações (PRÄNDL et al., 1994).

Além disso, o nitrito promove o desenvolvimento de aroma e sabor peculiares aos produtos curados, além de fixar a coloração dos mesmos, uma vez que a etapa inicial da formação da cor é a oxidação da mioglobina (vermelho púrpura) à metamioglobina (marrom) pela ação do nitrito, com redução simultânea do nitrito a óxido nítrico (NO). O óxido nítrico reage rapidamente com a metamioglobina formando um produto intermediário denominado nitrosomioglobina (ARAÚJO, 2008).

O pigmento de coloração vermelho-rósea (nitrosomioglobina) encontrado em produtos curados não submetidos ao aquecimento, é responsável pela coloração atrativa destes. Ao serem tratados termicamente, a desnaturação protéica da mioglobina desestabiliza a cor, formando um composto róseo, o nitrosohemocromo, mais estável devido à formação de ligações covalentes. Este pigmento, apesar de termoestável, é susceptível às reações de oxidação, que resultam na formação de porfirinas verdes, amarelas ou sem cor (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

O nitrato somente é utilizado em processos de cura mais longa, constituindo-se em uma fonte eficaz de nitrito (JUDGE; ABERLE ; FORREST, 1989).

A redução do nitrato a nitrito ocorre mediante a um processo bacteriano, necessitando porém de um número razoável de bactérias para tornar esta redução efetiva, sendo difícil determinar a concentração formada de nitrito no meio (ROÇA, 2005).

O inconveniente do uso do nitrito é a potencial formação de nitrosaminas, genericamente chamadas de N-compostos (NOC). Estas substâncias são formadas pela interação entre um grupo de nitrogênio secundário (que pode ser uma amina ou amida, uma alquil-uréia ou um anel peptídico) e um nitrito. Diversas nitrosaminas identificadas em vários produtos cárneos são consideradas, além de carcinogênicas, tóxicas, mutagênicas e teratogênicas. Desde 1972, Sander e Schweinsberg, demonstraram que as aminas e nitritos ingeridos na dieta poderiam reagir *in vivo* para produzir N-nitrosaminas, alertando as autoridades sanitárias para esta descoberta que poderia ocasionar em um sério problema de saúde pública (ARAÚJO, 2008).

Entre os alimentos apontados como os que elevam o risco, estão principalmente os defumados, carnes curadas, patês e outros alimentos conservados com sal de cura. Entre os que se associam a baixo risco, encontram-se as frutas e vegetais, uma vez que estes últimos contam com o efeito protetor da vitamina C, um antioxidante naturalmente presente nestes alimentos. Assim, recomenda-se o uso de ácido ascórbico em derivados cárneos, como forma de evitar a formação de nitrosaminas (APHA, 2001; ORDÓÑEZ, 2005).

O Art. 372 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 2008) estabelece que o emprego dos nitratos e nitritos de sódio ou de potássio ou de qualquer combinação entre eles, só podem ser feitos em quantidades tais que, no produto para consumo, o teor de nitrito não ultrapasse 200 mg/kg; e o art. 373 estabelece que os nitratos de sódio e potássio só podem ser empregados, isolada ou combinadamente, nas seguintes proporções máximas: a) 240g para cada 100L de salmoura (0,24%); b) 60g para cada 100kg de carne (0,06%), na cura a seco, em mistura com cloreto de sódio e c) 15g para cada 100kg de carne picada ou triturada, misturada com o cloreto de sódio.

Porém o Ministério da Saúde, através da Portaria nº 1004, limita o uso de nitrito em derivados cárneos (excluindo o charque) a uma concentração máxima de 150 mg/kg (BRASIL, 1999).

Além da questão envolvendo a formação de nitrosaminas, Okafor e Ogbonna (2003) ressaltam que a ingestão de nitrito pode ocasionar o surgimento de metahemoglobinemia que provoca sintomas desde cianose, dispnéia, cefaléia e fadiga, podendo levar ao óbito principalmente em crianças.

Em condições normais, os sais de nitrato e nitrito são absorvidos em nível gastrointestinal e o nitrato é eliminado pelos rins. Por sua vez, o nitrito complexa-se com a hemoglobina do sangue, formando metahemoglobina no complexo porfirínico, através da oxidação do íon ferroso a férrico. O composto formado (metahemoglobina) não consegue transportar oxigênio, porém uma enzima presente nos eritrócitos denominada NADH-metahemoglobina-redutase reverte a metahemoglobina à hemoglobina. Este processo de reversão é limitado, só ocorrendo quando há ingestão de pequenas concentrações de nitrito. Em casos de maior ingestão, este processo torna-se irreversível, aumentando assim a concentração de metahemoglobina no sangue levando o indivíduo a óbito quando atinge níveis acima de 50% (CORTAS; WAKID, 1991).

2.2.2 Açúcares

Reduzem a umidade e evitam a salga excessiva. Ao reduzirem a umidade, funcionam também como conservadores. Os açúcares mais utilizados são a sacarose e a glicose. Em determinados produtos, funcionam como substrato para micro-organismos desejáveis contribuindo para a melhoria do sabor e aroma do produto final. Em produtos curados, geram condições redutoras durante o processo, o que provavelmente faz com que as carnes curadas não desenvolvam aromas provenientes da oxidação lipídica, além de melhorar a coloração destes produtos, através da estabilização do Fe^{++} (ORDÓÑEZ et al., 2005).

2.2.3 Estabilizantes

Os estabilizantes são utilizados com a finalidade melhorar as características de cor, sabor e consistência dos produtos finais, além de manter as características estruturais das suspensões emulsões e cárneos (MINOZZO; WASZCZYNSKYJ; BEIRÃO, 2004).

Os mais utilizados são os polifosfatos de sódio ou potássio. Estes elevam o pH da carne, aumentando o espaço ao redor das proteínas, que será preenchido por moléculas de água presentes no meio, proporcionando maior retenção de água e conseqüentemente maior rendimento do produto final. Além de aumentar a capacidade de retenção de água, os estabilizantes à base de fosfatos atuam como antioxidantes, uma vez que possuem a capacidade de se ligar à metais pesados como íons ferrosos que podem estar presentes como contaminantes em sais de cura. Os íons ferrosos devem ser eliminados do meio em razão de

favorecerem as reações de oxidação lipídica, responsáveis pela deterioração do produto, promovendo alterações de sabor, odor e coloração (ORDOÑEZ et al., 2005).

2.2.4 Antioxidantes

Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, ‘os antioxidantes são substâncias que retardam o surgimento de alterações oxidativas nos alimentos’. Também são definidos pela *Food and Drug Administration* (FDA) como substâncias que prolongam a vida útil dos alimentos, prevenindo a perda de coloração e “*off flavours*” decorrentes da oxidação lipídica (SONDA, 2008).

O Decreto nº. 55.871 de 26 de Março de 1965 define antioxidante como ‘a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa nos alimentos’ (BRASIL, 1965).

Funcionam como auxiliares no processo de cura. Reduzem a metamioglobina a mioglobina, além de potencializar a produção de óxido nítrico a partir da adição de nitritos, desenvolvendo e estabilizando a cor dos produtos cárneos. A estabilização da cor ocorre em razão da exposição da superfície do produto curado à condições redutoras. Na presença de calor, há transformação dos pigmentos da carne em um composto estável, o nitrosohemocromo (ORDOÑEZ et al., 2005).

A adição de ácido ascórbico permite que o teor de nitrito seja reduzido para 1/3, sem que haja prejuízo da cor, através da redução do Fe^{++} naturalmente presente na carne (podendo agir como catalisador das reações de oxidação lipídica) em Fe^{+++} (ROÇA, 2006).

A concentração a ser utilizada deve estar entre 0,03 a 0,05% de ácido ascórbico ou 0,05 a 0,07% de ascorbato de sódio, porém é necessária a adição de 550mg/kg de ascorbato ou eritorbato para se impedir a formação de nitrosaminas. Além do ácido ascórbico e seus sais, o α -tocoferol também têm-se mostrado bastante eficiente como antioxidante. (ORDOÑEZ et al., 2005).

2.2.5 Água

A água influencia na palatabilidade dos produtos cárneos, contribuindo para sua textura e suculência. As proteínas miofibrilares (actina e miosina), solúveis em meio salino, permitem atingir a força iônica necessária para a sua solubilização. Durante este processo, estas proteínas são liberadas, constituindo-se em um gel. As proteínas sarcoplasmáticas solubilizam-se em água, sem necessidade de adição de sal, e permanecem solubilizadas mesmo após a adição deste. A quantidade de água adicionada definirá sua capacidade de emulsificação (ORDOÑEZ et al., 2005).

2.2.6 Condimentos

São utilizados na indústria de alimentos com o objetivo de conferir aroma e sabor aos produtos. Alguns condimentos possuem ainda propriedades antioxidantes e conservadoras. Contudo, quando em forma de pó, podem veicular contaminação física e microbiológica, sendo necessário um rigoroso controle de qualidade no momento de seu processamento. Algumas indústrias optam pela utilização de óleos essenciais, uma vez que estes são mais seguros do ponto de vista toxicológico e permitem uma melhor padronização dos produtos. (TONETTO, 2008).

O RIISPOA, em seu Artigo nº.785, define condimento como ‘o produto contendo substâncias aromáticas, sápidas, com ou sem valor alimentício, empregado com o fim temperar alimentos, dando-lhes aroma e sabor’ (BRASIL, 2008).

Os condimentos são agrupados em duas classes: os potencializadores de sabores, que incluem o glutamato monossódico, hidrolisados de proteínas, aminoácidos, dipeptídeos, maltol e etimaltol e produtos de combinação. O outro grupo inclui os saborizantes que são substâncias que imprimem sabor à fumaça; essências de fumo, extratos de fumo e condimentos de fumo, além de outros como ácidos naturais presentes nos alimentos, açúcar e sal de cozinha (ORDÓNEZ et al., 2005).

2.3 Micro-organismos Indicadores de Contaminação nos Alimentos

São micro-organismos capazes de identificar a ocorrência de contaminação no produto final, decorrente de possíveis falhas no processamento dos mesmos, principalmente às relacionadas à manipulação e armazenamento. Estes micro-organismos indicam se há presença de micro-organismos patogênicos que sobreviveram ao tratamento térmico, oferecendo risco potencial ao consumo, bem como a presença de outros micro-organismos relacionados à deterioração do produto que comprometeriam sua vida útil (MINOZZO; MALUF, 2007).

Sendo assim, a *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (1984), divide os micro-organismos indicadores em duas categorias: micro-organismos não danosos à saúde (Contagem Global de micro-organismos psicrotóxicos, mesófilos, termófilos, bolores e leveduras) e micro-organismos danosos à saúde (Coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, Enterococos e Enterobactérias totais) (SILVA, 2002).

2.3.1 Coliformes totais

As bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, fazem parte deste grupo. São bacilos Gram-negativos, não esporogênicas. Quando mantidas em temperatura de 35 a 37°C por 48h, estas bactérias podem fermentar a lactose produzindo gás diferentemente de outras bactérias, o que possibilita sua determinação presuntiva (JAY, 2005).

São representadas pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, sendo que somente a *Escherichia coli* tem no trato intestinal do homem e animais homeotérmicos seu hábitat primário. Os demais gêneros, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como na vegetação e no solo, resistindo por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Salmonella* e *Shigella*. Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

2.3.2 Coliformes termotolerantes

Este grupo é representado pelas mesmas bactérias correspondentes ao grupo dos coliformes totais, porém neste caso, estas bactérias continuam fermentando a lactose, produzindo gás, quando submetidas à temperatura de incubação de 44 a 45°C (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Neste caso, a presença de *E.coli* indica que houve contaminação de origem fecal (DOYLE; BEUCHAT; MONTIVILLE, 2001).

2.3.3 Estafilococos coagulase positivo (*Staphylococcus aureus*)

O gênero *Staphylococcus* são cocos organizados em formato de cachos de uva, Gram-positivos e catalase positivos, com ótimo de crescimento em faixa de 7 a 47,8°C e produção de enterotoxinas entre 10 e 46°C, sendo o *Staphylococcus aureus* o maior responsável pela incidência de doenças, incluindo as gastro-enterites. Utilizam aminoácidos como fonte de nitrogênio e tiamina e ácido nicotínico como fonte de vitaminas do complexo B, sendo que em ambientes anaeróbios, necessitam também de uracil. Toleram altas concentrações de sal (até 20% em alguns casos, dependendo do pH, da temperatura e da atividade de água do meio), apresentam ótimo de pH de crescimento entre 6,0 e 7,0, podendo multiplicar-se em pH entre 4,0 e 9,8. Em condições anaeróbias foi observada inibição do crescimento e produção de toxinas em presuntos curados apresentando pH abaixo de 5,3 mantidos à 30°C e pH menores que 5,58 em temperatura de 10°C (JAY, 2005).

Os estafilococos estão presentes principalmente nas vias aéreas e garganta, além de nos cabelos e na pele de 50% dos indivíduos saudáveis. Esta incidência pode ser ainda maior em indivíduos associados ou que entram em contato com indivíduos doentes e ambientes hospitalares. Os alimentos comumente relacionados às intoxicações causadas por *S.aureus* envolvem carnes e produtos cárneos derivados, frangos, produtos elaborados à base de ovos e saladas como as de atum, galinha e batata (FORSYTHE, 2002).

2.3.4 *Salmonella* spp

A *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, sendo uma bactéria Gram-negativa, não esporogênica e anaeróbia facultativa. Produz ácido e gases resultantes do metabolismo da glicose e outros carboidratos maiores, além de produzir catalase e H₂S. Utilizam o citrato como fonte única de carbono. Não produz oxidase, indol e acetoina, não hidrolisando também a uréia. Porém, descarboxila aminoácidos como a lisina e a ornitina (DOYLE et al., 2001; D'AOUST; MAURER, 2007).

É geralmente mesofílica, com temperatura ótima de crescimento entre 35 e 40°C, sendo que alguns sorovares multiplicam-se em temperaturas em torno de 54°C (termofílicas) e ainda outros entre 2 e 4°C (psicrotróficas). É termolábil, sendo eliminada com calor à 60°C/15 a 20 minutos. Em condições de pH entre 6,5 e 7,5 e atividade de água maior que 0,94, apresenta seu ótimo de crescimento, podendo sobreviver em alimentos com atividade de água bem mais baixa por até 1 ano, como alimentos em pó (pimenta, chocolate, gelatina) e em manteiga de amendoim (D'AOUST; MAURER, 2007; FERREIRA; CAMPOS, 2008; BAILEY et al., 2010).

2.3.5 Bactérias lácticas

Dependendo das condições de armazenamento, os produtos cárneos representam um excelente meio para o crescimento microbiano, mesmo quando mantidos sob refrigeração, quando há o favorecimento de crescimento de bactérias Gram-negativas aeróbias como as *Pseudomonas* e anaeróbias tolerantes ao CO₂ como os *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Carnobacterium* spp e *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Weisella* spp. Estes micro-organismos são responsáveis pela deterioração destes produtos, causando acidez, descoloração, produção de gás, formação de líquido viscoso e variações de pH (CHENOLL et al., 2007).

2.3.6 *Clostridium botulinum* (clostrídios sulfito redutores)

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria Gram-positiva em forma de bacilo, e esporogênica que se desenvolve em meio anaeróbico, podendo ser mesófilo, termófilo ou psicrotrófico, dependendo de sua espécie (JAY, 2005).

É frequentemente encontrado no ar, poeira, solo (podendo vir a contaminar frutas, legumes e verduras), sedimentos aquáticos e fezes humanas e de animais como: aves, eqüinos e bovinos (EDUARDO et al., 2002; FREAN, 2004).

Ocasionalmente pode vir a contaminar carnes cruas e conseqüentemente seus derivados (ROBERTS; SMART, 1976).

Uma vez que seus esporos são relativamente resistentes ao calor, à baixa atividade de água e à alta concentração de sal, os processos de cura e pasteurização largamente utilizados em produtos cárneos minimamente processados, podem não ser suficientes para eliminá-lo totalmente (HAUSCHILD; HILSHEIMER, 1980).

O primeiro relato histórico de botulismo em humanos data do período de 886 a 912 a.C, em que um Imperador da era Macedônica, conhecido como Leo VI proibiu o consumo de lingüiças feitas à base de sangue de animais (chouriço), em razão da diversidade de casos de intoxicação associados a este alimento (JAY, 2005).

Em 1793 na cidade de Wildbad, Wurtemberg na Alemanha, ocorreram 13 casos de intoxicação e seis óbitos, após o consumo de lingüiças produzidas com sangue e embutidas em tripas naturais de suíno (JAY, 2005).

Justinus Kerner, 27 anos depois (1820) ao estudar 230 casos de intoxicação em Wurtemberg, concluiu que as lingüiças foram contaminadas em razão do cozimento inadequado e da ausência de oxigênio no interior do produto. Em sua homenagem, a doença ficou conhecida como “enfermidade de Kerner” (WALTER; LEDERMANND, 2003).

Em 1896 Emile Pierre e Van Ermengem, da Universidade de Ghent (Ellezelles, Bélgica), isolaram um bacilo anaeróbio, após a investigação de amostras de presunto cru servidas a 26 membros de um clube de música, cuja ingestão causou 23 casos de intoxicação e três óbitos. O micro-organismo responsável pela intoxicação ficou conhecido como *Bacillus botulinus*, em razão de sua forma observada em bastonete e da referência ao alimento encontrado (lingüiça, em latim “*botulus*”). Mais tarde, o mesmo bacilo foi denominado *Clostridium botulinum* em razão de sua forma de “*closter*” ou espeto (SMITH, 1994; JAY, 2005).

No Brasil, o relato da primeira epidemia de botulismo ocorreu no Rio Grande do Sul em 1958, com óbito de nove pessoas em razão do consumo de conserva caseira de peixe (SANTIAGO, 1972).

Em 1982, outro caso ocorreu no Rio de Janeiro, pelo consumo de patê de galinha armazenada em condições favoráveis ao desenvolvimento do *Clostridium botulinum*, ocasionando a morte de um indivíduo (SERRANO, 1982).

Até então imaginava-se que o micro-organismo restringia-se apenas a alimentos cárneos, quando surgiu, em 1990 o primeiro relato com alimentos vegetais em São Paulo, envolvendo a toxina botulínica do tipo A. O produto contaminado em questão foi palmito em conserva (EDUARDO, 2002).

O botulismo é uma doença de início súbito, causada pela exotoxina solúvel do *Clostridium botulinum*. O desenvolvimento evolutivo da doença está relacionado à quantidade de toxinas produzidas, além do período de incubação, de modo que quanto mais curto for este período, maior o risco de óbito. (FUNASA, 2002).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) há quatro categorias epidemiológicas distintas para o botulismo, sendo estes o botulismo infantil,

botulismo por intoxicação alimentar, botulismo por lesão e botulismo indeterminado. (FERREIRA et al, 1987).

O botulismo alimentar é causado pela ingestão de potentes exotoxinas de origem protéica previamente formadas por diferentes tipos de *Clostridium botulinum*, que, ao serem absorvidas são transportadas através do sangue até neurônios sensíveis (KEET; STROBER, 2005).

Como principais sintomas da intoxicação observam-se: dificuldade respiratória, fraqueza muscular ou paralisia, ataxia, pupilas fixas e dilatadas e queda das pálpebras. As membranas da mucosa da boca, língua e faringe apresentam-se secas. Náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia, por vezes antecedem o início dos sintomas neurológicos, porém, a constipação é comum à medida que o envolvimento neurológico progride (JUNQUEIRA, 1994).

Estes sintomas podem ser ocasionados pela ingestão por via oral ou parenteral das toxinas, podendo ser absorvidas por meio do contato destas com as mucosas da boca, nariz e garganta ou em contato com os intestinos grosso e delgado e estômago, uma vez que as enzimas digestivas não são capazes de inativá-la completamente. Após contato com as mucosas, as toxinas são rapidamente absorvidas pela corrente sanguínea e seguem para o sistema nervoso periférico, atingindo os nervos (JAY, 2005).

No caso da intoxicação por via oral, os sintomas podem surgir entre 12 e 72 horas após a ingestão do alimento contaminado. Uma vez instalado, o botulismo pode durar por mais de 10 dias, dependendo da resistência do hospedeiro, com elevado índice de mortalidade (30 a 65%). Por ser uma doença de rápida evolução, o sucesso do tratamento depende de um diagnóstico preciso e administração de soros específicos (JAY, 2005).

Os demais tipos de botulismo ocorrem através de infecção, multiplicação e produção de toxinas produzidas por *Clostridium botulinum* no trato gastrointestinal e em feridas (CARDOSO et al., 2004; KEET; STROBER, 2005).

A morfologia do *Clostridium botulinum* e de seus esporos, respectivamente, são vistos nas Figuras 1 e 2.



Copyright©A.Dowsett/Photoresearch Ers'spl)

Figura 1. Morfologia do *Clostridium botulinum*
Fonte: www.offthecontrary.blogspot.com



Copyright ©David B. Fankhauser, Ph.D, 2001

Figura 2. Morfologia dos esporos de *Clostridium botulinum* em aumento de 2000x
Fonte: www.bacterialanatomy.mht

Os esporos do *Clostridium botulinum* são as formas mais resistentes entre todas as demais bactérias, podendo sobreviver a temperaturas de 100°C por algumas horas. Por esta razão, é recomendado que os alimentos sejam submetidos a tratamento térmico a 121°C por 30 minutos (KETCHAM; GOMEZ, 2003).

A germinação dos esporos de *Clostridium botulinum* é favorecida quando o alimento encontra-se em anaerobiose (embalagens hermeticamente fechadas, como vidro e enlatados), alta atividade de água e pH superior a 4,5. Nestas condições, as células vegetativas são capazes de produzir toxinas no interior da embalagem do alimento durante seu período de estocagem (SCARCELLI; PIATTI, 2002).

Há relatos de que, quando presentes em matrizes líquidas, estes esporos podem sobreviver por mais de trinta anos e ainda por um tempo maior em matrizes sólidas (RADOSTITS et al., 2002).

Com relação a especificidade sorológica de suas toxinas, existem 7 tipos diferentes de *Clostridium botulinum* (A, B, C, D, E, F e G). Os tipos A, B, E, F e G causam doença em humanos, enquanto o tipo C em aves, gado e outros animais e o tipo D está relacionado especificamente ao consumo de forragem pelo gado, principalmente no Sul da África (JAY, 2005).

Em 1970, Holdeman e Brooks sugeriram que os diferentes tipos de *Clostridium botulinum* fossem separados em grupos, baseados em suas semelhanças metabólicas (JUNQUEIRA, 1994). Este agrupamento ainda é utilizado atualmente (BRASIL, 2011).

Assim, foram dispostos em 4 grupos:

Grupo I: incluindo todas as cepas do tipo A e as cepas proteolíticas dos tipos B e F. Estas cepas são capazes de fermentar alguns tipos de carboidratos;

Grupo II: incluindo todas as cepas do tipo E e as cepas não-proteolíticas dos tipos B e F. São cepas fortemente sacarolíticas, fermentando açúcares com grande produção de gases.

Grupo III: incluindo todas as cepas dos tipos C e D, sendo não proteolíticas ou fracamente proteolíticas.

Grupo IV: incluindo todas as cepas do tipo G, proteolíticas, incapazes de fermentar carboidratos.

Os tipos e condições consideradas ótimas para estes diferentes grupos são vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Tipos e condições ótimas das toxinas botulínicas

CARACTERÍSTICAS	GRUPOS			
	I	II	III	IV
Neurotoxina	A, B***, F***	B, E, F	C, D	G
Temperatura mínima	10	3	15	nd*
Temperatura ótima	35-40	18-25	40	37
[NaCl]	10	5	nd*	nd*
Aw	0.94	0.97	nd*	nd*
Proteolítico	+	-	-	+**

* nd = não definido

** proteolítico em presença de tripsina (JAY, 2005)

*** algumas linhagens (JAY, 2005)

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2011)

De acordo com Johnson e Bradshaw (2001) e Jay (2005), estes sete tipos de *Clostridium botulinum* (A a G) produzem sete neurotoxinas diferentes sorologicamente entre si.

O tipo A foi descoberto e isolado primeiramente em 1904 por G. Landman, sendo a mais letal do que os tipos B ou E. Como características adicionais às apresentadas na Tabela 1, estão: o fato de seu habitat primário ser terrestre, a temperatura máxima de crescimento ser de aproximadamente 50°C, o pH mínimo para o crescimento de 4,7, haver produção de H₂S, ácido propiônico e lipase e ocorrer fermentação da glicose (JAY, 2005).

De modo geral, as toxinas atuam nas junções neuromusculares, provocando paralisia motora. Seus efeitos atingem fundamentalmente os nervos periféricos, que utilizam a acetilcolina como mediadora dos movimentos. As toxinas botulínicas atuam de forma geral, unindo-se à membrana nervosa, inibindo a liberação da acetilcolina. Sem os impulsos nervosos provocados por esta, ocorre paralisia flácida e morte, uma vez que os músculos responsáveis pela respiração são também paralisados (SOUZA, 2001).

Porém, não há comprometimento do sistema nervoso central, devido à barreira hematoencefálica. Assim, não há perda de consciência nos pacientes acometidos pela doença (SOUZA, 2001).

A função normal das junções neuromusculares e como ocorre a atuação das toxinas botulínicas nas mesmas são vistas nas Figuras 3 e 4 respectivamente.

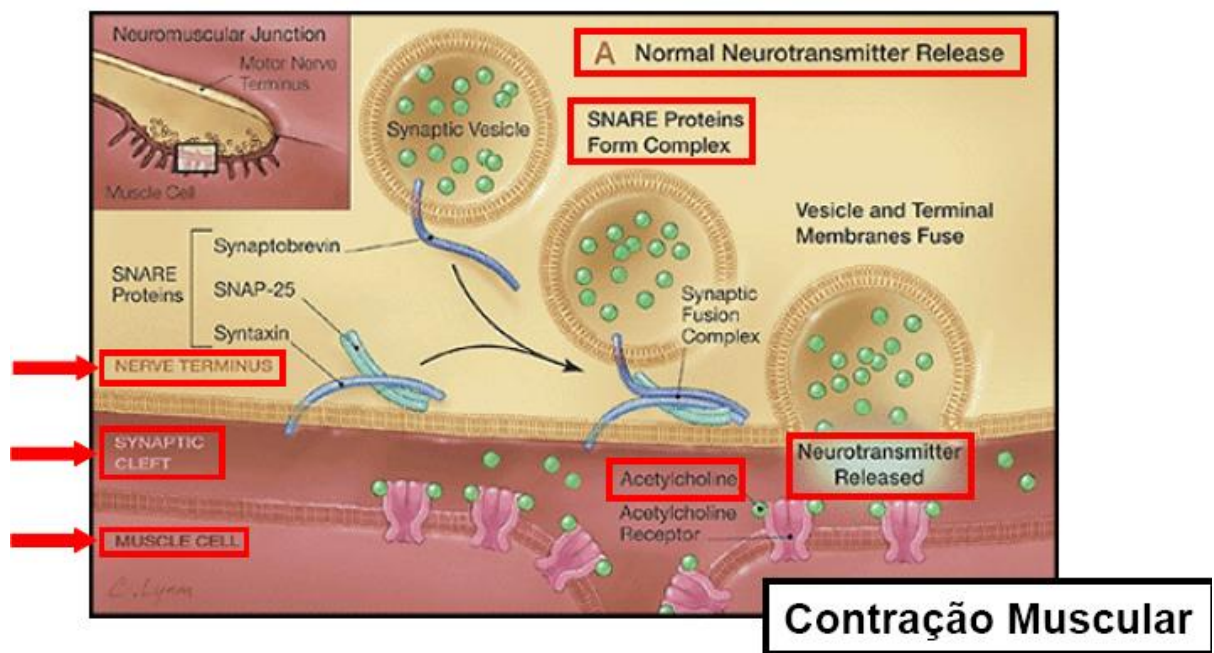


Figura 3. Função neurotransmissora normal
 Fonte: Journal American Medical Association, 2001

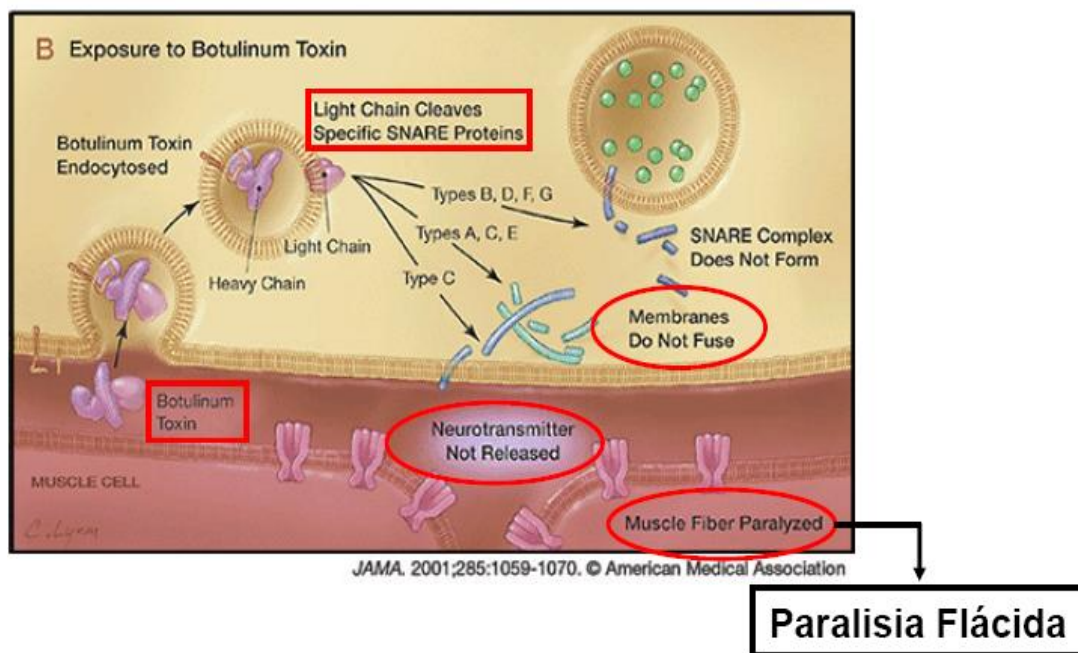


Figura 4. Mecanismo de ação da toxina botulínica
 Fonte: Journal American Medical Association, 2001

A dose considerada letal em seres humanos não é bem conhecida, porém estima-se que, para a toxina tipo A, por exemplo, em um indivíduo pesando 70kg seja de 0,09 a 0,15 µg administrados por via intravenosa ou intramuscular, 0,70 a 0,90 µg quando a contaminação ocorre por via aérea e 70 µg por via oral. Estas dosagens foram baseadas extrapolando-se os

valores encontrados para doses letais em primatas. Em camundongos, 1g foi capaz de exterminar 30 milhões deles (STEPHEN, 2001).

Apesar de sua poderosa ação letal, essas toxinas são termolábeis, perdendo sua atividade quando submetidas à temperatura ambiente por 12 horas, à 100°C por 5 minutos ou 80°C por 30 minutos. Além disso, também são destruídas quando expostas à luz solar por 1 a 3 horas ou quando colocadas em contato com água clorada por 20 minutos. Esta última condição elimina 84% das toxinas (PINILLOS et al., 2003).

Mesmo conhecendo-se as formas de eliminação da toxina botulínica, os casos de botulismo ainda acometem uma série de indivíduos em diversas partes do mundo. Os alimentos mais implicados são as conservas vegetais, condimentos e especiarias, produtos cárneos e à base de peixes. A dificuldade na identificação de um alimento contaminado por *Clostridium botulinum* está no fato de que nem sempre ocorrem alterações aparentes no mesmo, como alteração de coloração, aroma, sabor e textura. No caso de alimentos enlatados, a produção de gás pode ser verificada pelo estufamento da embalagem, porém nem sempre esta pode apresentar estufamento aparente (JAY, 2005).

Alguns casos mundiais de botulismo de origem alimentar e os alimentos relacionados são vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Casos de botulismo no mundo (adaptada)

PAÍS	DOENTES	ALIMENTO ENVOLVIDO
Itália	8	Queijo cremoso
Estados Unidos	39	Ovo em conserva (1 caso) e 38 casos com pimenta (Texas)
África	2	Peixe enlatado
Portugal	5	Presunto
Alaska	8	Muktuk (baleia)

Fonte: Ministério da Saúde, 2011 (dados até 18/01/2011)

No Brasil, os casos de botulismo só começaram a ser registrados a partir de 1999, com a criação do Centro de Referência do Botulismo (CR BOT) em São Paulo, sendo oficializado em Novembro de 1999 pela Resolução SS nº 165 de 16/11/99), possibilitando assim a implantação do programa através do Instituto Adolfo Lutz. O CR BOT, em acordo com o Centro Nacional de Epidemiologia (CENEPI/MS) passou a registrar casos em todo o território nacional. Porém, somente em Outubro de 2001, através da Portaria GM/MS nº 1943, de 18/10/01) o botulismo foi considerado doença de notificação compulsória no Brasil (EDUARDO; SIKUSAWA, 2002).

Os casos suspeitos e confirmados de botulismo ocorridos no Brasil, principalmente entre 1999 (quando iniciaram-se os registros dos mesmos) e 2011 são vistas na Figura 5.

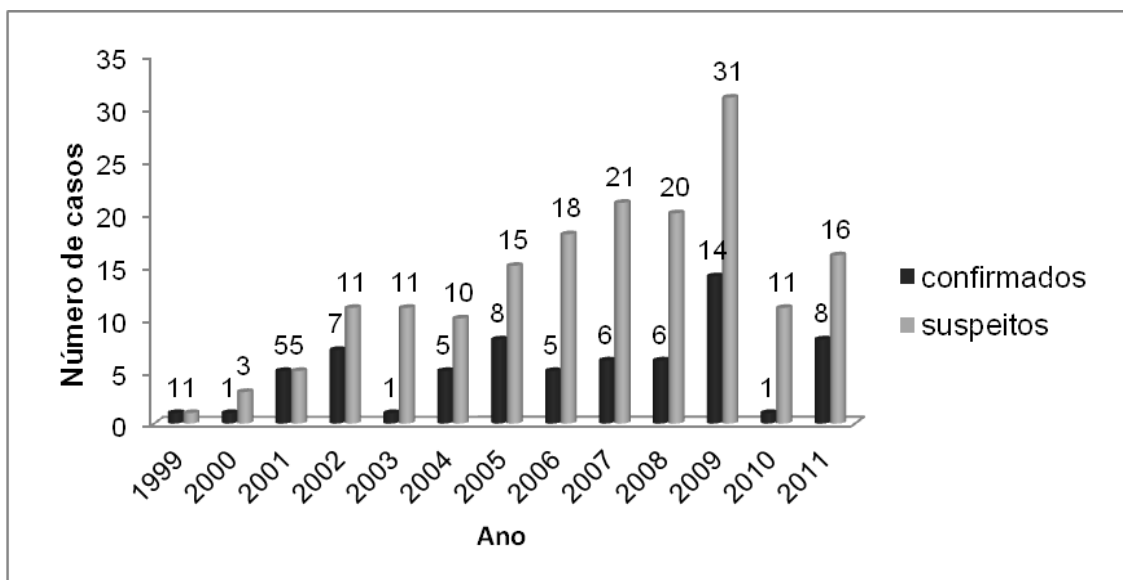


Figura 5. Casos suspeitos e confirmados de botulismo no Brasil entre 1999 e 2011
 Fonte: Ministério da Saúde, 2011 (dados até 13/06/2011)

Foram totalizados 173 casos suspeitos, sendo 68 confirmados. Destes 68 casos confirmados, 66 foram de origem alimentar (97%), um botulismo por fermento e um botulismo intestinal.

Estes mesmos casos confirmados vistos na Figura 5 são vistos especificando-se as regiões em que ocorreram na Figura 6.

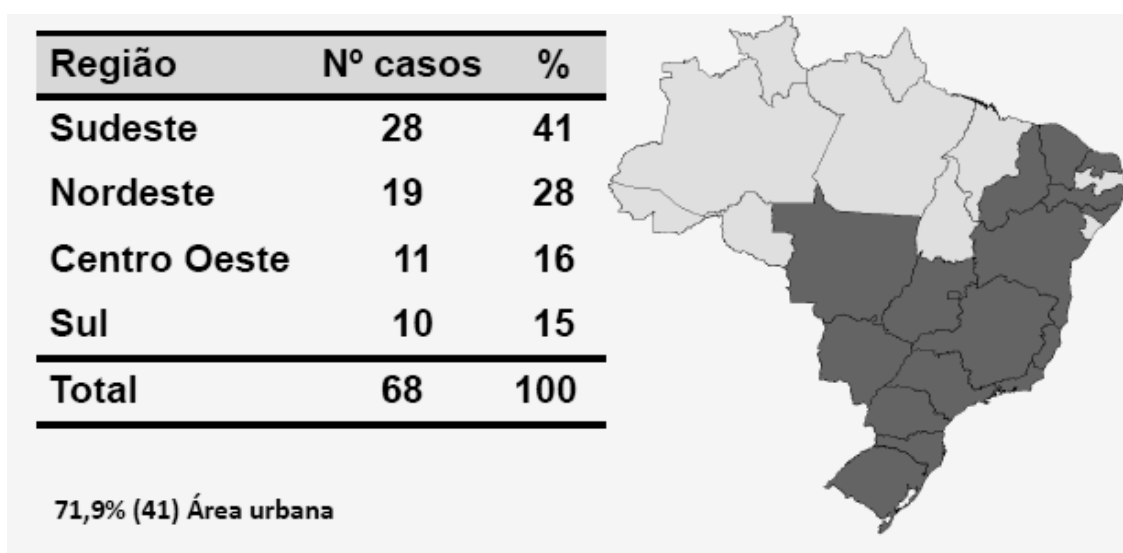


Figura 6. Casos de botulismo por regiões do Brasil
 Fonte: Ministério da Saúde, 2011 (dados até 19/05/2011)

Observa-se que o maior número de casos registrados ocorreu na região Sudeste, principalmente em áreas urbanas. Este fato pode ser explicado em razão do maior consumo de alimentos industrializados nesta região, principalmente embutidos e enlatados, uma vez que nestas regiões, o cotidiano mais agitado tem levado os consumidores a ingerirem mais alimentos semi-prontos e sanduíches, muitas vezes cozidos de forma insuficiente para

eliminar toxinas botulínicas. A emergência de produtos refrigerados prontos para o consumo, onde não há um cozimento prévio também pode ter contribuído para o aumento do número de casos nesta região do país. Em áreas rurais, ao contrário das áreas urbanas, ainda há predomínio de uma alimentação mais natural, com alimentos frescos e de rápido consumo, além do cozimento prolongado.

Esta explicação pode ser confirmada pela observação das Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Alimentos envolvidos em casos de botulismo

ALIMENTO	NÚMERO DE CASOS	%
Produtos suínos	15	23
Sardinha enlatada/mortadela	11	17
Palmito	6	9
Torta de frango	9	14
Tofu	4	6
Outros	5	7
Ignorado	16	24
Total	66	100

Fonte: Ministério da Saúde, 2011 (dados até 19/05/2011)

Tabela 4. Origem dos alimentos envolvidos em casos de botulismo

ORIGEM	NÚMERO DE CASOS	%
Caseira	21	31
Industrializada	26	40
Comercial	10	15
Ignorado	9	14
Total	66	100

Fonte: Ministério da Saúde, 2011 (dados até 19/05/2011)

A prevenção do surgimento do *Clostridium botulinum*, consiste basicamente em procedimentos capazes de evitar a germinação dos esporos, a multiplicação dos micro-organismos e conseqüente produção de toxinas do *Clostridium botulinum* nos alimentos. Alimentos que apresentam pH entre 4,5 e 8,9, acondicionados em embalagens hermeticamente fechadas, atividade de água acima de 0,93 e concentração de cloreto de sódio abaixo de 8% são potencialmente botulogênicos. A esterilização comercial, com redução subsequente de temperatura (refrigeração ou congelamento) constituem uma forma bastante eficiente na prevenção de contaminação. Porém, a esterilização em temperatura e/ou tempo insuficientes, aliada a oscilações de temperatura de refrigeração torna os esporos viáveis, permitindo a germinação, multiplicação do *Clostridium botulinum* com conseqüente produção de toxinas (CERESER et al., 2008).

A palatabilidade da carne diminui a medida que aumenta a temperatura de processamento. Produtos cárneos “comercialmente estéreis” apresentam forte e típico aroma sulfídrico devido à desnaturação protéica, além de alterações em outros atributos sensoriais como textura.

2.4 Novo Perfil do Consumidor - Dieta Saudável

De forma geral, os maus hábitos alimentares tem sido associados à populações de países com alto índice de desenvolvimento, como Estados Unidos e Europa. Porém, observa-se uma crescente tendência também nos países em desenvolvimento de se consumir alimentos pouco saudáveis, principalmente aqueles que contém substâncias mais susceptíveis à oxidação, como produtos de origem animal (com alto teor de ácidos graxos saturados e colesterol), e redução no consumo de frutas, verduras e legumes (FERRARI; TORRES, 2002).

Deste modo, doenças crônicas, incluindo as cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, osteoporose, síndrome metabólica e câncer, são as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, acometendo indivíduos em todas as faixas etárias. Além dos maus hábitos alimentares, o estilo de vida mais estressante, o sedentarismo e o tabagismo contribuem para aumentar a probabilidade de acometimento destas doenças (CORDAIN et al., 2005).

De acordo com o Guia Alimentar para a População Brasileira (2008), uma dieta saudável considerando-se 2000 Kcal, é aquela em que os lipídios não devam ultrapassar 30% das calorias totais da dieta. Porém deste total, é recomendado que o consumo de gordura saturada seja menor que 10% do valor energético total (VET), enquanto que as poliinsaturadas devem atingir até 10% das calorias totais, as monoinsaturadas os 10% restantes. Com relação às gorduras trans, estas devem contribuir com menos de 1% do VET (máximo de 2g/dia), enquanto o consumo de colesterol deve ser menor que 300mg/dia. Os feijões e outros alimentos ricos em proteínas devem participar da dieta na proporção mínima de 5% do VET, sendo recomendado o consumo combinado de 1 parte de feijão e duas partes de arroz, uma vez que desta forma, garante-se o aporte ideal de proteínas da dieta (DE ANGELIS et al., 1982a; 1982b; SOUZA, 1973). Recomenda-se o consumo diário de 3 porções de leite e derivados e 1 porção de carnes, peixes ou ovos, de modo a corresponderem a um total de 20% de proteína. Os carboidratos devem corresponder de 55 a 75% do VET, sendo que, deste total, 45 a 65% devem ser carboidratos complexos, principalmente na forma integral). Assim, os açúcares monossacarídicos e dissacarídicos deve ser limitados à uma quantidade máxima de 10% do VET, ou 1 porção diária. As fibras então devem ser consumidas em uma proporção de 25 gramas/dia. As proteínas devem ser ingeridas na proporção de 10 a 15% do VET. O consumo de sal deve ser limitado à 5g/dia. Uma dieta preventiva de doenças crônicas deve conter no mínimo 400g/dia (9 a 12% da ou 5 porções de hortaliças e frutas. Quanto ao consumo de laticínios, estes devem ser pobres em gordura, e quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, recomenda-se um consumo diário máximo de duas doses (30g de etanol) para os homens e uma dose (15g de etanol) para as mulheres. A ingestão diária de água potável deve ser de, no mínimo 2L.

Em mais um esforço para reduzir seus índices de obesidade, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) regulamentou um ícone de alimentação saudável, que vem sendo utilizado desde Janeiro de 2012 e é denominado programa “My Plate” (meu prato). Este novo conceito (mais simples) substitui a antiga pirâmide que vinha sendo utilizada desde 1990 por profissionais da área de saúde em diversos países do mundo. Fundamentalmente, o programa recomenda a redução do uso de sal, a substituição de bebidas doces por água e o aumento no consumo de vegetais (30% da dieta), frutas (20%) e grãos integrais (30%), que na prática, correspondem à ingestão de 2 ½ xícaras de vegetais, 2 xícaras de frutas e 6 porções de grãos diariamente. Os alimentos protéicos contribuem com os 20% restantes da dieta (5 ½ porções), preferindo-se as carnes magras. Com relação ao consumo de laticínios, o ideal é que sejam ingeridas 3 xícaras de leite com baixo teor de lipídios (USDA, 2011).

Em meio a esse novo panorama mundial, em que a população e os governos têm se mostrado mais preocupados com a saúde, há uma maior demanda por alimentos que possam contribuir significativamente para uma melhoria na qualidade de vida. Conseqüentemente, o conceito de alimentos funcionais é cada vez mais difundido nos meios acadêmicos e em diversos setores da indústria alimentícia.

De acordo com diversas organizações internacionais, como o *International Food Information Council* (IFIC), e o *International Life Sciences Institute of North America* (ILSI), alimentos funcionais são aqueles que, em virtude de apresentarem componentes fisiologicamente ativos, apresentam benefícios à saúde, além da nutrição básica, estando relacionados à redução do risco de manifestação de certas doenças (FAGUNDES; COSTA, 2003).

Sgarbiere e Pacheco (1999), relatam que o conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão, na década de 1980, com a idéia de que alguns alimentos possuíam a capacidade de prevenir certas doenças crônicas degenerativas e assim, melhorar a qualidade de vida da população.

A Euromotor estima que o mercado global de alimentos funcionais movimenta aproximadamente 50 bilhões de dólares, e apresente um ritmo de crescimento de cerca de 10% ao ano, índice três vezes maior do que o de produtos alimentícios convencionais (GOTTLIEB; CRUZ; BODANESE, 2008).

Esta perspectiva mostra que já existe um consenso mundial de que os alimentos não devam mais ser vistos somente como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também sejam fonte de bem estar e saúde, o que vem aumentando ainda mais a demanda por alimentos que proporcionem melhoria na qualidade de vida da população (DEVLIÉGHÈRE et al., 2004).

A indústria (P&D) tem clara a tendência de crescimento na busca por produtos mais saudáveis e com qualidade nutricional balanceada, contendo mais ingredientes naturais, livres de aditivos químicos e novas formas de tratamento. Além da questão nutricional, é também de suma importância que estes produtos possuam características sensoriais satisfatórias, apresentando bom aspecto visual, textura adequada e sabor atrativo, a fim de garantir boa aceitação de mercado.

Neste contexto, o consumo de derivados cárneos pode ser visto como prejudicial à saúde, em razão de serem tradicionalmente adicionados de conservadores químicos, além de ricos em ácidos graxos de cadeia saturada e íons sódio. Contudo, o processamento destes produtos permite a substituição de alguns compostos potencialmente danosos ao organismo, por aditivos naturais e ingredientes com propriedades funcionais. Deste modo, é possível agregar mais benefícios nutricionais inerentes ao consumo de carne e limitar componentes indesejáveis, adequando-os assim à nova demanda de mercado (COLMENERO, 2005).

As formas mais comuns de se introduzir componentes benéficos aos produtos cárneos são: via alimentação dos animais de abate, através da adição destes componentes às rações e pela adição direta destes componentes às formulações (SANCHES-MUNIZ, 2005).

2.5 Ingredientes de Elaboração do Patê dentro do Contexto de Alimento Saudável

2.5.1 Carne de peito de frango

A carne de peito de frango é leve e de boa digestibilidade. Sem pele, seu consumo é recomendado para pessoas de várias faixas etárias, principalmente para aqueles que seguem dietas de emagrecimento e que possuam doenças cardiovasculares (VENTURINI et al., 2007).

O peito de frango cru, em base úmida é composto por aproximadamente 23,03% de proteína de alto valor biológico, aumentando significativamente com o cozimento (em água por exemplo, chega a 29,81%) (ROSA et al., 2006).

Apresenta menor teor de lipídios (aproximadamente 1,19% quando cozido) do que a alcatra bovina de raças européias (aproximadamente 6,8%) e o lombo suíno (aproximadamente 4,8%), sendo constituída principalmente por ácidos graxos monoinsaturados, além de possuir baixo teor de colesterol, apresentando cerca de 85,00mg/100g quando cozido ou grelhado, enquanto que a alcatra bovina de raças européias e o lombo suíno apresentam cerca de 89,00mg/100g e 79,00mg/100g respectivamente (ROSA et al., 2006; VALLE, 2000; LOFGREN, 2005).

Além disso, possui quantidades significativas de vitaminas do complexo B, como: niacina, vitamina B6 e ácido pantotênico, não apresentando perdas significativas destas vitaminas mesmo após o cozimento (VENTURINI; SARCIELLI; SILVA, 2007; VALLE, 2000).

2.5.2 Sal comum x sal “light”

Quando adicionado à carne, o cloreto de sódio (NaCl) possui importantes propriedades de liga, sabor, aroma e preservação. O sal favorece a extração de actina e miosina, proteínas miofibrilares que irão contribuir para a formação da emulsão cárnea e de gordura e para o aumento da capacidade de retenção de água, reduzindo as perdas por cozimento, além de melhorar algumas características do produto, tais como: textura, coloração e suculência (ORDÓÑES et al., 2005).

A interação do sal com tecidos magros e/ou gordos presentes na carne, promove o desenvolvimento de sabor e aroma aos produtos, uma vez que produz compostos aromáticos desejáveis (ORDÓÑES et al., 2005).

Baixas concentrações de sal prejudicam significativamente o sabor dos produtos (RUUSUNEN; POULANNE, 2004).

O sal possui ação bacteriostática sobre a maioria dos micro-organismos, retardando a deterioração dos produtos onde está presente. Na membrana celular dos micro-organismos, a concentração de água é igual à concentração de sal, em ambos os lados da mesma, permitindo o deslocamento da água tanto para seu interior, como para o exterior. Uma vez que no meio extracelular a concentração de sal torna-se superior à concentração no meio intracelular (aproximadamente 5% em solução salina), há uma difusão da água no interior da célula para o exterior da célula microbiana, para manter a homeostase, ocorrendo plasmólise. A célula microbiana então se desestabiliza, ocasionando a inibição do crescimento do micro-organismo e em seguida, sua morte (CICHOSKI; TERRA, FREITAS, 2004; TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

Na concentração de 5%, há inibição completa das bactérias anaeróbias, principalmente do *Clostridium botulinum*, não havendo inibição de bactérias aeróbias. Porém, quando a concentração de sal é superior a 10%, há inibição de praticamente todas as bactérias, exceto as halotolerantes. Contudo, o sal provoca a oxidação da mioglobina, acarretando em formação de metamioglobina, de coloração escura indesejável na carne (ORDÓÑES et al., 2005).

O desempenho de diversas funções em produtos cárneos, torna a adição de sal indispensável à carne e seus derivados. O sal contém 40% de íons sódio. O consumo de sódio é fundamental ao organismo, uma vez que ele regula o teor de água dentro das células, participando também da transmissão do impulso nervoso e muscular (ANDERSON et al., 2007).

A necessidade mínima de sódio varia entre 300 e 500mg/dia para indivíduos acima de 2 anos de idade. Porém, o uso do sal em excesso (acima de 6g diárias ou 2,4g de sódio) pode se tornar prejudicial à saúde, causando aumento da pressão arterial, além de problemas cardiovasculares como derrames, infarto do miocárdio e câncer de estômago (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989a, 1989b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1982,

1990b, 2003a; WORLD CANCER RESEARCH FUND, 1997; UNITED NATIONS ADMINISTRATIVE COORDINATING COMMITTEE, 2000).

Assim a indústria tem lançado no mercado o chamado sal “*light*”, com a finalidade de reduzir os problemas causados pelo excesso de íon sódio. Segundo Nascimento (2007), o sal *light* é composto por uma mistura de cloreto de sódio (50%) e cloreto de potássio (50%). Embora ambos possam ser chamados de sal, eles atuam de formas diferentes no organismo: o potássio regula a retenção de líquidos dentro das células, enquanto o sódio age fora destas.

Apesar de ser recomendado a pessoas com hipertensão, o sal “*light*” não é indicado para pessoas com problemas renais, uma vez que pode ocasionar um acúmulo de potássio no organismo, aumentando os riscos de problemas cardiovasculares. Além disso, o cloreto de potássio não pode substituir integralmente o cloreto de sódio, uma vez que pode conferir sabor amargo ao produto final (NASCIMENTO, 2007).

2.5.3 Linhaça

A linhaça é uma oleaginosa, muito rica nutricionalmente (ALMEIDA, 2009), sendo constituída por teores significativos de proteínas (20 a 25%), lipídios (30 a 40% incluindo ácido α -linolênico (ω -3)), fibras dietéticas solúveis e lignina (20 a 28%), vitaminas lipossolúveis A, D e E e hidrossolúveis do complexo B, além de ser fonte de minerais como potássio, fósforo, magnésio, cálcio e enxofre (OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2009).

Assim, os componentes nutricionais presentes na linhaça têm sido relacionados como inibidores de algumas doenças, como: osteoporose, diabetes, lúpus, câncer de próstata, de mama e de cólon, doenças cardiovasculares, hepáticas e renais (CARRARA et al., 2009).

Algumas pesquisas indicam que para se obter os benefícios do consumo da linhaça, é necessária a ingestão diária de 10g na forma triturada, a fim de facilitar a absorção dos nutrientes. Uma vez que quanto mais triturada a semente, mais susceptível ela se torna à oxidação lipídica, é recomendado que a mesma seja triturada somente momentos antes de sua ingestão (CREDIDIO, 2005; OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2009).

2.5.4 Vinho tinto

Os polifenóis são compostos naturalmente presentes em plantas com a função de prevenir o estresse oxidativo e retardar a formação de radicais livres. Atuam como antioxidantes em razão de possuírem propriedades de oxi-redução, doando hidrogênio e eliminando oxigênio singlete (SOUSA et al., 2007; GUERRA, 2001).

A proporção de polifenóis encontrada no vinho tinto é superior (1000- 4000 mg/L) à encontrada no vinho branco (200-300 mg/L). Isso se deve a vários fatores entre eles o processo de armazenamento para obtenção do vinho. Em alguns tipos de vinho tinto, as uvas são esmagadas com a casca e a semente, gerando maior quantidade de compostos polifenólicos (MARIATH et al., 2007).

Diversos estudos comprovam que o hábito de consumir vinho, principalmente o tinto na região Mediterrânea, reduz consideravelmente o risco de doenças cardiovasculares severas que podem levar à morte (KUSCHI; LENART; WILLETT, 1995).

As concentrações dos polifenóis presentes no vinho tinto têm sido manifestadas pela redução da agregação plaquetária e oxidação do LDL. Em estudos com ratos, alguns autores observaram que estes compostos induziram a vasodilatação em vários segmentos da artéria, além de promover efeitos positivos como sensibilidade à insulina, o que permitiu reduzir os casos de nefropatia causada por diabetes. (LEIGHTON; URQUIAGA, 1999; GERMAM; WALZEM, 2000; SVILAAS et al., 2004; MARIATH et al., 2007; SBC, 2001; SBH, 1994).

Em razão da elevada demanda de oxigênio, o cérebro torna-se bastante vulnerável a danos ocasionados por radicais livres, desencadeados por uma série de fatores. A maioria das ações biológicas protetoras a este órgão foi associada a um composto fenólico antioxidante com alta capacidade sequestrante de radicais livres, denominado resveratrol (trans-3,5,4'-Trihydroxystilbene). Este composto é responsável ainda por prevenir doenças cardiovasculares, reduzindo as taxas de lipídios séricos e danos causados por estresse oxidativo, possuindo também efeito antiproliferativo (BACHUR et al., 2009).

Os demais flavonóides presentes no vinho, como as quercetinas, cianidinas e antocianinas também exercem uma potente ação antioxidante (GIEHL et al., 2007), atuando contra radicais livres, (FERRARI; TORRES, 2002; KUSCHI; LENART; WILLETT, 1995; MACHADO; SANTIAGO, 2001) e inibindo o surgimento de alergias, inflamações, úlceras, viroses, tumores e doenças hepáticas e renais, além de inibir a agregação plaquetária, o que reduz o risco de cardiopatias e trombozes (SOUZA et al., 2006.; ANJO, 2004).

Algumas pesquisas mostram que, mesmo sob tratamento térmico, não há perdas importantes dos compostos bioativos contidos no vinho. Ao avaliarem a capacidade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos do vinho tinto e do suco de uva submetidos a altas temperaturas, TEÓFILO et al. (2011) concluíram que não houve perdas consideradas significativas destes compostos em ambas as bebidas, na temperatura de 100°C por até 60 minutos.

2.5.5 Azeite de oliva

O consumo de azeite promove uma série de benefícios à saúde, uma vez que constitui a maior fonte natural de ácidos graxos monoinsaturados dietéticos, principalmente ácido oléico (ω -9), presente em concentrações que variam de 68 a 81,5% (PIMENTEL; MAGNONI; COSTA, 2007, QUILES; RAMÍREZ-TORTOSA ; YAQOUB, 2006). Os ácidos graxos monoinsaturados (oléico) possuem a vantagem de reduzir os triglicérides plasmáticos, através da diminuição da síntese hepática de VLDL - colesterol (lipoproteína de muito baixa densidade), sem reduzir o HDL – colesterol (lipoproteína de alta densidade), que exerce efeito protetor das artérias e vasos sanguíneos.

O azeite de oliva extra virgem é obtido pelo processo de prensagem à frio, preservando os compostos fenólicos naturalmente presentes no mesmo. Estes compostos fenólicos atuam como antioxidantes, mantendo os níveis de HDL-colesterol, evitando assim a oxidação lipídica e aumento do LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade). O aumento do LDL-colesterol contribui para o surgimento de aterosclerose, doenças cardiovasculares, crônico-degenerativas (PIMENTEL; MAGNONI; COSTA, 2007) e alguns tipos de câncer. (KUSCHI; LENART; WILLETT, 1995; NACIF et al., 1998; TRICHOPOULOU; VASILOPOULOU, 2000).

Em um estudo realizado com ratos com altos índices de lipídios séricos, De La Cruz et al. (2000) observaram uma acentuada redução nos índices de oxidação lipídica no cérebro (20,3%), nas plaquetas (72,0%), na artéria aorta (63,6%) e no coração (84,5%) em animais que estavam sendo alimentados com ração adicionada de azeite de oliva.

Com relação à estabilidade quando submetido ao tratamento térmico, Penz (2010) relatou que o azeite de oliva manteve seu perfil lipídico em temperaturas de cozimento (em torno de 100°C). Porém a autora ressalta que temperaturas acima de 180°C devem ser evitadas, e que o ideal seria o uso do azeite em temperatura ambiente, sob forma de tempero para saladas.

2.5.6 Soja

A soja é uma leguminosa rica em um composto fenólico denominado isoflavona, também conhecida como isoflavonóide, sendo um fitoestrógeno largamente encontrado em produtos de origem vegetal (SETCHELL, 1998).

Diversos estudos comprovam que os fitoestrógenos tem a capacidade de desempenhar importante papel no controle de diversas doenças crônicas. Apesar de não possuir estrutura química de esteróides, as isoflavonas atuam como estrógenos, apresentando também função antioxidante e capacidade de inibir a atividade enzimática, regulando diversos processos metabólicos (SETCHELL, 1998).

Esta característica explica de que forma as isoflavonas protegem o organismo de problemas cardiovasculares e câncer de mama, cólon e próstata, além de reduzir o colesterol sérico e prevenir perdas ósseas em razão da menopausa e osteoporose (BRANDI, 1997).

O controle genético dos grãos de soja, aliados às condições climáticas durante o desenvolvimento do grão tem influência direta sobre a concentração de isoflavonas na soja (CARRÃO-PANIZZI et al., 1998; TSUKAMOTO et al., 1995), de modo que à 20°C, a concentração de isoflavonas é maior do que a 25°C (CARRÃO-PANIZZI et al., 1999).

A ingestão de 25g de proteína de soja, que equivale a cerca de 30 a 50mg de isoflavonas é recomendado como auxiliar na redução do colesterol sérico (SETCHELL, 1998).

O uso da proteína de soja em produtos cárneos emulsionados é particularmente interessante no sentido de manter a estabilidade e a qualidade da massa cárnea (OLIVO; SHIMOKOMAKI, 2006).

2.5.7 Iogurte

De acordo com Brasil (2004), iogurte é o alimento proveniente do processo de fermentação do leite esterilizado ou pasteurizado, adicionado de culturas microbianas, tais como: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrieki* subsp. *bulgaricus*, que atuam de forma simbiótica no meio.

O iogurte é um produto bastante interessante sob o ponto de vista nutricional, apresentando basicamente a mesma constituição do leite que lhe deu origem, tornando seus nutrientes ainda mais digeríveis e portanto mais biodisponíveis em razão da hidrólise destes no processo de fermentação (ÇON et al., 1996; FERNÁNDEZ-BAÑARES et al., 2006).

Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), o leite apresenta cerca de 87% de água, 3,35% de proteína (principalmente caseína), 4,7% de carboidratos (sendo 4,6% de lactose), 4,0% de lipídios e 0,7% de sais minerais. Dentre estes minerais, destaca-se a presença de cálcio, magnésio, potássio e sódio, além de carbonatos, sulfatos e fosfatos (SPREER, 1991; ORDÓÑEZ et al., 2005).

A porção lipídica do leite também apresenta pequenas quantidades de vitaminas A, D e E (VARNAN; SUTHERLAND, 1994).

Além dos fatores nutricionais, o iogurte oferece benefícios à saúde pela presença de bactérias probióticas, responsáveis por algumas funções fundamentais no organismo, tais como: regularização das funções intestinais (FAO, 2001), ativação do sistema imunológico (PUUPPONEN-PIMIÄ et al.; 2002) e melhoria na absorção de nutrientes.

A redução do pH, provocada pela transformação da lactose em ácido láctico e o aquecimento favorecem a precipitação da caseína, resultando na formação de um gel protéico ácido, o que confere textura cremosa característica ao produto (O'DONNELL; BUTLER, 2002).

2.6 Fatores que Influenciam diretamente na Qualidade do Patê contendo Ingredientes Funcionais

Fatores intrínsecos e extrínsecos podem determinar o tipo de crescimento microbiano, bem como as condições gerais de um produto. Os fatores intrínsecos são predominantemente químicos (concentração e disponibilidade de nutrientes, pH, potencial redox, atividade de água, oxidação lipídica e estrutura do alimento), enquanto os extrínsecos estão relacionados ao armazenamento e às condições de processamento, sendo a temperatura e a disponibilidade de oxigênio os principais parâmetros de controle utilizados para prolongar a vida útil dos produtos. O respeito à higiene em todas as etapas do processo, bem como o resfriamento rápido e adequado são de grande importância para a qualidade final dos produtos cárneos (CASTELLANO et al., 2008).

A inclusão de ingredientes funcionais aos alimentos, de modo a prevenir o surgimento de diversas doenças causadas pelo déficit de nutrientes deve ser incentivada e cada vez mais adotada pelas indústrias processadoras de carnes e derivados. Porém, alterações em formulações clássicas devem ser acompanhadas de rígidos controles de qualidade, a fim de evitar o surgimento de micro-organismos emergentes (FERNÁNDEZ-GINÉS et al., 2005), além da necessidade de uma reavaliação e adequação de todas as condições de processamento, através de estudos que permitam verificar as possíveis interações ocorridas entre seus ingredientes.

2.6.1 Composição química

Alterações na cadeia produtiva e na composição dos alimentos pode favorecer o crescimento de micro-organismos oportunistas, possibilitando o surgimento de doenças de origem alimentar (FERNÁNDEZ-GINÉS et al., 2005). Uma vez que a maioria dos micro-organismos necessita de água disponível para sua sobrevivência, solutos como o cloreto de sódio auxiliam na conservação dos produtos, reduzindo a atividade de água dos mesmos.

Jakobsen e Murrel (1977) verificaram que houve inibição de esporos de *Clostridium botulinum* e *Bacillus* quando a atividade de água do meio alcançou 0,95 em razão da adição de cloreto de sódio, ocorrendo menor inibição quando o soluto adicionado era a glicose ou o sorbitol.

A alta concentração de lipídios bem como sua constituição em termos de ácidos graxos também pode prejudicar a qualidade do produto, aumentando sua susceptibilidade à oxidação lipídica (GRAY, 1978).

Micro-organismos utilizam açúcares, álcoois e aminoácidos como fonte de energia, sendo que um número menor pode utilizar lipídios. Contudo, os aminoácidos são a principal fonte de nitrogênio utilizada por organismos heterotróficos (JAY, 2005). Devido ao elevado teor protéico, a carne e seus produtos derivados constituem em um meio de cultura perfeito para o desenvolvimento microbiano.

2.6.2 Oxidação lipídica

Qualitativamente, a carne é constituída principalmente por lipídios e proteínas. Uma vez expostos ao oxigênio, os lipídios tornam-se susceptíveis à rancidez, como resultado de reações de oxidação que atuam principalmente sobre os ácidos graxos poliinsaturados. (ALLEN; ALLEN, 1981).

A auto-oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração da carne e seus derivados. Outras reações de deterioração causadas por micro-organismos e enzimas podem ser controladas através da redução de temperatura, o que não ocorre na prevenção das reações de oxidação, uma vez que estas ocorrem mesmo em baixa energia (GRAY, 1978).

Porém, cuidados com a temperatura de resfriamento são fundamentais para a qualidade do produto final, uma vez que o cozimento não é o mais importante no desencadeamento das reações de oxidação, e sim o resfriamento subsequente de produtos cárneos cozidos, quando ocorre a liberação de ferro não heme, principal responsável por estas reações (MILLER et al., 1994).

A deterioração oxidativa de lipídios nos alimentos envolve, primeiramente, reações oxidativas que são acompanhadas por várias reações secundárias de caráter oxidativo e não oxidativo. O ponto de partida para a oxidação de alimentos são principalmente os ácidos graxos essenciais (ácido oléico, linoléico e linolênico). A susceptibilidade e o grau de oxidação desses ácidos graxos se devem à forma um tanto geométrica em relação ao seu grau de insaturação. A oxidação de ácidos graxos tem sido explicada pela ação de outros oxidantes ou sistemas enzimáticos, envolvendo um radical livre, através de um mecanismo em cadeia que envolve as etapas de iniciação, propagação e terminação (GRAY, 1978; ALLEN; HAMILTON, 1983; RAHARJO; SOFOS, 1993).

Os hidroperóxidos, originados na etapa de propagação são compostos muito instáveis, de natureza transitória, que sofrem transformações e ligações com os radicais livres. A ruptura dessas ligações provoca o surgimento de produtos secundários, como o pentanal, hexanal, 4-hydroxionenal e o malondialdeído (PEARSON; GRAY, 1983; RAHARJO; SOFOS, 1993). Esses compostos podem ser os responsáveis pelo desenvolvimento de “*off flavours*” ou por desencadear reações com outros constituintes dos alimentos, como as proteínas (GRAY, 1978).

Uma vez ativadas, essas reações provocam comprometimento da qualidade da carne e de seus derivados, causando mudanças na cor, sabor, aroma e textura dos produtos, além de reduzir seu valor nutritivo, reduzindo a concentração de ácidos graxos de cadeia insaturada. (ERIKSSON, 1982; LOVE, 1983; FENNEMA, 2010).

Assim, a aceitabilidade do produto dependerá do grau de degradação provocada. Vários trabalhos tem sido realizados no sentido de investigar os efeitos que certos antioxidantes causam na estabilidade dos produtos. Algumas análises podem identificar o grau de oxidação dos alimentos, porém a análise sensorial é um dos métodos de avaliação mais sensíveis e eficientes. Conseqüentemente, muitos métodos químicos e físicos tem sido desenvolvidos para quantificar a deterioração oxidativa com o objetivo de correlacionar os dados encontrados com o desenvolvimento de “*off flavour*” (GRAY, 1978).

O malondialdeído é um dialdeído, composto por três carbonos com grupos carbonil nas posições C-1 e C-3. Existem diferentes teorias sobre os possíveis mecanismos de formação deste, através de hidroperóxidos formados à partir de ácidos graxos poliinsaturados, com três ligações duplas (trienos) ou mais associados à fosfolipídios, um dos primeiros substratos em alimentos de origem animal (GRAY, 1978).

Dahle et al. (1962) postulou um mecanismo para a formação do malondialdeído, baseado na observação de que somente os peróxidos que possuíam insaturações α ou β para o grupo peróxido foram capazes de sofrer ciclização para finalmente formar malondialdeído.

Este composto possui efeito tóxico, carcinogênico e mutagênico (NEWBURG; CONCON, 1980).

Assim, o controle da oxidação lipídica deve ser avaliada, a fim de evitar efeitos danosos à qualidade do produto e à saúde do consumidor.

A análise de TBARS baseia-se na reação à 100°C e pH entre 1 e 2 (BERSET; CUVELIER, 1996) envolvendo uma molécula de malonaldeído com 2 moléculas de TBA,

formando um composto de coloração avermelhada cujo espectro de absorção ocorre entre 532 a 535 nm (BERSET; CUVELIER, 1996; SIMS; FIORITI, 1980; KOSUGI; KATO; KIKUGAWA, 1989).

2.6.3 Tratamento térmico

O tratamento térmico possui a finalidade de reduzir ao máximo o número de células viáveis de micro-organismos, a fim de garantir a segurança do produto final. Tratamentos térmicos muito agressivos, com temperaturas muito elevadas por longos períodos são capazes de destruir um número maior de células microbianas, porém reduzem também os nutrientes disponíveis no alimento, além de causar alterações organolépticas perceptíveis. Assim, a fim de assegurar a qualidade microbiológica, nutricional e sensorial do alimento, torna-se necessário o uso combinado de duas ou mais formas de conservação, possibilitando a aplicação de tratamentos térmicos mais brandos quando um agente conservador é adicionado ao alimento (FELLOWS, 1988; AZEREDO, 2004).

2.6.4 Uso de aditivos

Os consumidores buscam cada vez mais alimentos que sejam seguros, com o mínimo de processamento, utilizando menos aditivos químicos e com qualidade sensorial. Em resposta à essas demandas conflitantes, as tendências atuais na indústria de alimentos pesquisam o uso de inibidores alternativos que garantam a segurança alimentar. A bioconservação ganha atenção crescente como meio de controle natural, estendendo a vida útil dos produtos cárneos. A aplicação de bioprotetores para garantir a qualidade higiênico-sanitária é uma ferramenta promissora, embora deva ser considerada apenas como uma medida adicional às boas práticas de fabricação, processamento, armazenamento e distribuição (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995).

2.7 Bacteriocinas (Antimicrobianos Naturais)

Uma série de agentes antimicrobianos são encontrados naturalmente em alguns animais, micro-organismos e plantas, que os utilizam como forma de defesa contra agentes externos. Entre eles estão as quitosanas, presentes no camarão, a lisozima na clara do ovo, os flavonóides nas ervas e especiarias e as bacteriocinas produzidas por alguns tipos de micro-organismos (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Bacteriocinas são peptídeos, produzidos por algumas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com ação letal ou inibidora sobre outras bactérias relacionadas com a espécie que originou a bacteriocina (DESMAZEAUD, 1997).

Possuem a vantagem tecnológica de não alterar as características sensoriais dos produtos aos quais são adicionadas, conferindo-lhe boa aplicabilidade na indústria de alimentos (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

A forma de utilização pode ser através da inoculação de culturas iniciadoras ao alimento sendo produzidas no processo de fermentação; pelo uso direto da bacteriocina já purificada (SCHILLINGER; GEISEN; HOLZAPFEL, 1996; NASCIMENTO et al., 2008), por imersão, sob forma de lipossomas (COLAS et al., 2007) e em embalagens ativas (GUIGA et al., 2009).

Sua natureza química faz com que essas substâncias sejam facilmente degradadas no trato gastrointestinal do homem e animais (PIARD; DESMAZEAUD, 1992).

Relata-se que as primeiras bacteriocinas conhecidas foram as colicinas, oriundas de *Escherichia coli*. À partir da descoberta de que a produção desses compostos não se limitava ao grupo dos coliformes, o termo 'bacteriocina' foi proposto por Jacob et al. em 1953 para

proteínas antimicrobianas produzidas por micro-organismos Gram-positivos e negativos. (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

Diversas bacteriocinas possuem bom potencial de aplicação em alimentos. Dentre elas, destacam-se: a lacticina 481, (sintetizada por *Lactococcus lactis subsp.lactis*), capaz de inibir o crescimento de *Clostridium botulinum* e bactérias ácido lácticas; a pediocina A (sintetizada por *Pediococcus pentosaceus*), capaz de inibir o crescimento de bactérias ácido lácticas; *Clostridium*, *Listeria* e *Staphylococcus* e a subtilina (sintetizada por *Bacillus subtilis*,) que atua sobre diversas bactérias Gram-positivas (BARNBY-SMITH, 1992).

As bacteriocinas produzidas por *E. faecium* DPC 1146 mostraram-se efetivas na inibição do desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* no leite (PARENTE; HILL, 1992).

A enterocina CCM 4231 reduziu as células viáveis de *S.aureus* SA1 em leite desnatado, em leite utilizado em formulações infantis e em iogurte (LAUKOVÁ et al., 1999).

Entretanto, somente as bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas como a nisina têm sido objeto de estudos para aplicações clínicas (inibição do desenvolvimento de patógenos) e em alimentos como bioconservador (KAUR et al., 2011).

De forma geral, as bacteriocinas são produzidas quando há elevada concentração de células microbianas e uma pequena quantidade de nutrientes disponíveis no meio (LEROY; DE VUYST, 2001; ZAMFIR; GROSU-TUDOR, 2009).

Alguns fatores porém limitam a ação das bacteriocinas, tais como: presença de esporos bacterianos ou micro-organismos patogênicos resistentes à bacteriocina; presença de proteases e processos de oxidação; alta concentração de lipídios; adição de outros aditivos que poderiam inibir sua atuação; baixa solubilidade do meio e pH acima de 6,0 (SCHILLINGER; GEISEN; HOLZAPFEL, 1996).

Erroneamente, as bacteriocinas muitas vezes são classificadas como antibióticos, sendo estes proibidos na conservação de alimentos. As diferenças clássicas entre ambos, podem ser vistas na Tabela 5.

Tabela 5. Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos

CARACTERÍSTICAS	ANTIBIÓTICOS	BACTERIOCINAS
Modo de produção	sintetizados por enzimas	síntese ribossomal
Fase de produção	Metabolismo secundário	metabolismo primário
Mecanismo de ação	Diversos	membrana citoplasmática
Aplicação clínica	Sim	Não
Resistência microbiana	cepas resistentes	cepas resistentes
Ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo humano	não são digeridos	são digeridas

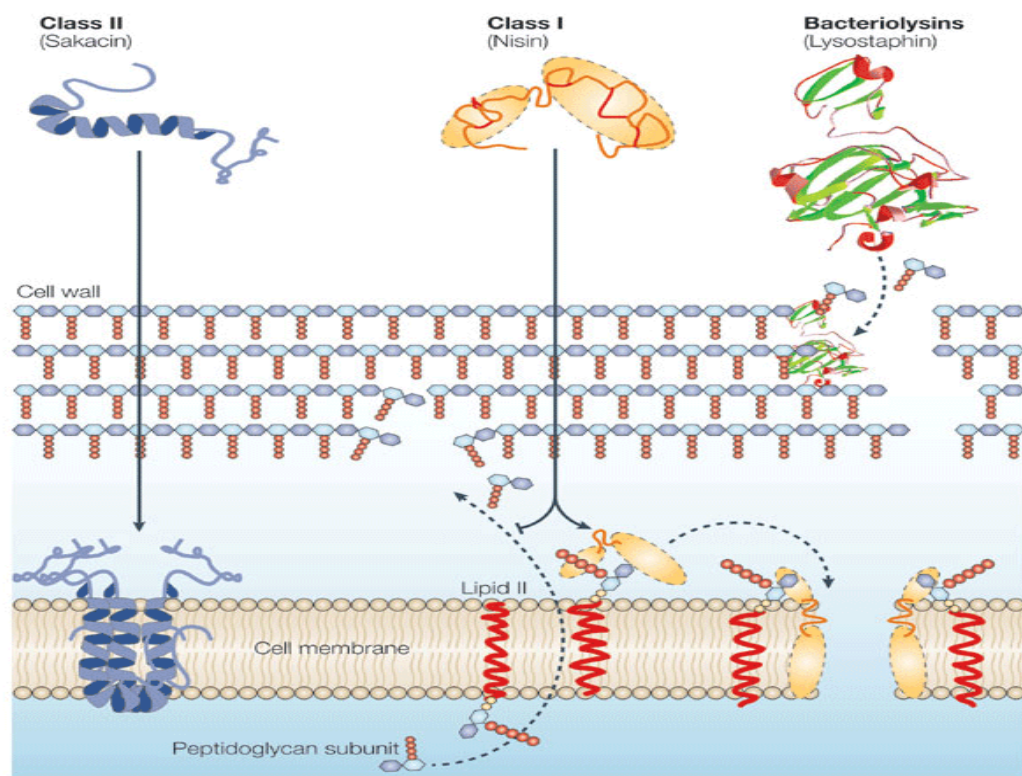
Fonte: Cleveland et al., 2001

Existem três classificações para as bacteriocinas, sendo a primeira descrita por Klaenhammer (1993), a segunda por Cotter et al. (2005) e a terceira e mais recente, descrita por Drider et al. (2006). De acordo com esta última classificação, as bacteriocinas são divididas genética e bioquimicamente, em muito se assemelhando com a primeira classificação de Klaenhammer (1993).

A classe I seria representada pelos lantibióticos, estáveis ao calor e compostos por aminoácidos diferenciados formando pequenos peptídeos (em torno de 3KDa), cujo

mecanismo de ação é através da desestabilização da parede celular e da formação de poros na membrana, provocando efluxo de K^+ , aminoácidos e ATP e consequente morte celular (BREUKINK et al., 1999); a classe II por peptídeos um pouco maiores que os da classe I (em torno de 10KDa) estáveis ao calor e constituídos por uma estrutura helicoidal. Seu mecanismo de ação baseia-se no fato deste tipo de estrutura possibilitar sua penetração na membrana das células alvo, despolarizando-a e desestabilizando-a, o que ocasiona sua morte. Também é proposta 3 subclasses, em que IIa é representada por bacteriocinas que possuem maior especificidade pela *Listeria monocytogenes* (KAISER; MONTVILLE, 1996), IIb que atuam somente com a combinação de dois peptídeos (GARNEAU et al., 2002) e IIc representado por bacteriocinas que possuem uma estrutura cíclica com ligação covalente nas terminações C e N (MAQUEDA et al., 2008). A classe III é composta por proteínas de grande peso molecular (acima de 30KDa), sensíveis ao calor. Seu mecanismo de ação atua na lise da parede celular dos micro-organismos (KLAENHAMMER, 1993; COTTER et al., 2005).

O mecanismo de ação de algumas bacteriocinas é visto na Figura 7.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Figura 7. Mecanismo de ação de algumas bacteriocinas

Fonte: http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n10/fig_tab/nrmicro1273_F2.html

2.7.1 Nisina

A nisina, produzida por *Lactococcus lactis subsp. lactis* (ATCC 11454), foi descoberta em 1928 possuindo um amplo espectro de ação contra bactérias Gram – positivas, não se

mostrando muito eficaz contra bactérias Gram - negativas, bolores e leveduras (DELVES-BROUGHTON, 2005).

O nome “nisina” é originário de N – Inhibitory Substance, sendo adicionado o sufixo “in” uma vez que foi utilizado para tratamento de mastite na Segunda Guerra Mundial em razão da ausência de penicilina (DE VUYST; VANDAMME, 1994).

Um estudo *in vitro* mostrou que sua atividade depende da composição fosfolipídica do meio. A quantidade de cargas negativas de lipídios é importante para a sensibilidade das células à nisina. Assim, é provável que a parede celular de bactérias Gram-negativas, composta de lipopolissacarídeos e proteínas, funcionem como barreiras à permeabilidade celular, impedindo que a nisina atinja a membrana citoplasmática destes micro-organismos (DUFOUR et al., 2003).

No entanto, seu uso pode ser potencializado quando a nisina é combinada à outras formas de conservação, como: agentes quelantes (EDTA, ácido fosfórico e ácido cítrico (BLACKBURN et al., 1998; CUTTER; SIRAGUSA et al., 1994; GUERRA et al., 2005), pressão hidrostática (YUSTE et al., 1998) e calor (BUDU-AMOAKO et al., 1999), provocando injúria e desordem da parede celular do micro-organismo, expondo assim a membrana celular à sua ação (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002). No caso da adição de agentes quelantes, a desestabilização se dá pela combinação entre os íons bivalentes de Ca^{++} e Mg^{++} , presentes na camada lipopolissacarídica, indisponibilizando-os (MILLETTE; SMORAGIEWICZ; LACROIX, 2004).

A síntese da nisina é bastante complexa, envolvendo processos de transcrição, tradução, modificações post-tradução, secreção, processamento e início de transdução. A nisina apresenta-se sob duas formas: nisina A e nisina Z, diferindo-se entre si apenas pelo tipo de aminoácido que ocupa a posição 27, sendo ocupado pela histidina no caso da nisina A e pela asparagina na nisina Z (SANGRONIS; GARCÍA, 2007), sendo que a nisina comercial Nisaplin™ é constituída pela forma A. Porém, em pH acima de 6,0, a nisina Z apresenta maior solubilidade do que a nisina A, uma vez que a cadeia lateral da asparagina é mais polar do que a cadeia lateral da histidina (MATSUSAKI et al., 1996).

A conformação estrutural da nisina é vista na Figura 8.

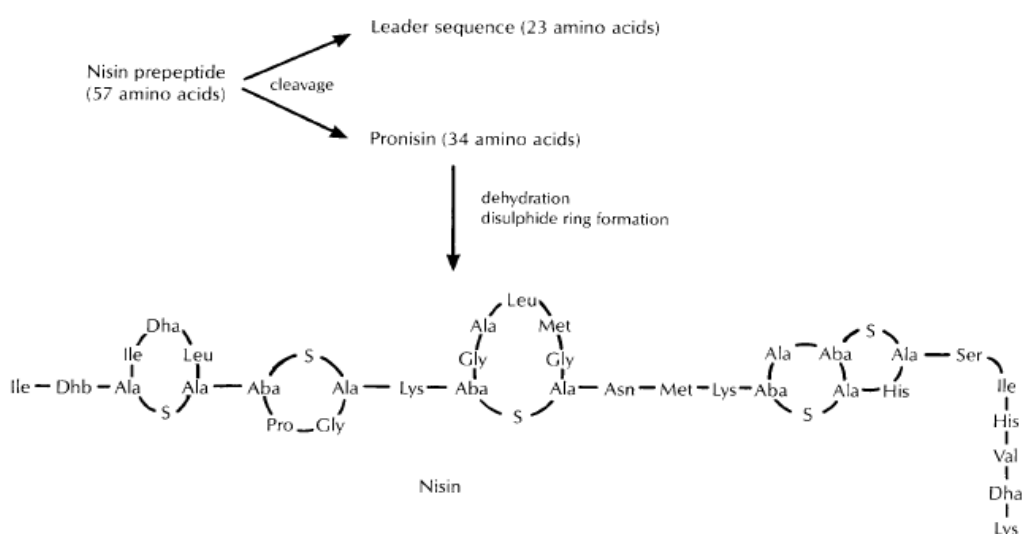


Figura 8. Modificações pós translação na formação da nisina
Fonte: Smith, 1992

A nisina formada é um pequeno peptídeo, com peso molecular de aproximadamente 3500 Da. Sua estrutura, formada por anéis internos que ligam os 34 resíduos de aminoácidos entre si através de pontes dissulfeto, torna-a resistente a tratamentos térmicos de até 121°C/15 min em pH entre 2,0 e 3,5, suportando esta mesma temperatura, porém em menor tempo quando o pH do meio está entre 5,0 e 7,0. É sensível à enzima σ -quimotripsina e resistente à tripsina, elastase, carboxipeptidase A, pepsina e erepsina (HURST; HOOVER 1993; DELVES-BROUGHTON et al., 2005).

Entre estes aminoácidos, há a presença de lantionina e resíduos de β -metil lantionina, o que a classifica como um lantibiótico (COTTER; HILL; ROSS, 2005). Estes aminoácidos, aliados à presença de dehidroalanina (DHA) e dehidrobutirina (DHB) é que conferem resistência térmica e ação bactericida à molécula de nisina (DE VUYST; VANDAMME, 1992).

A estrutura em aminoácidos da nisina sintetizada é vista na Figura 9.

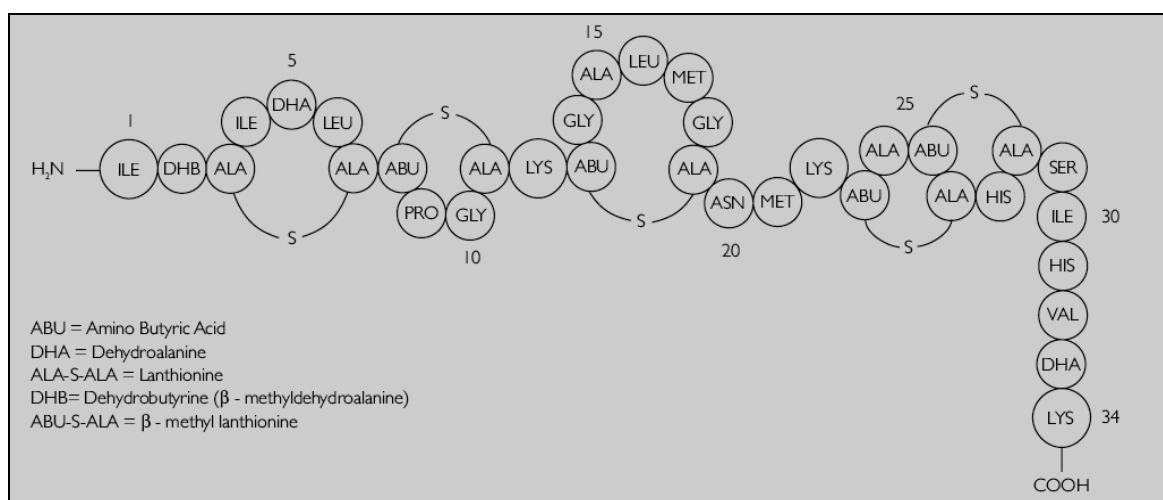


Figura 9. Aminoácidos presentes na estrutura primária da nisina
Fonte: De Vuyst; Vandamme, 1994

Em sendo uma molécula catiônica (em razão da presença dos aminoácidos lisina e histidina), a nisina é mais eficaz quando há um aumento percentual de moléculas aniônicas na membrana citoplasmática (McAULIFFE et al., 1998; BHATTI VEERAMACHANEM; SLELEF, 2004).

A nisina atua de forma diferente em células vegetativas e esporos. O mecanismo de ação da nisina sobre as células vegetativas de micro-organismos baseia-se na interação eletrostática da mesma com os fosfolípidios carregados negativamente presentes na membrana citoplasmática (ABEE; KROCKEL; HILL, 1995; RAJU; SHAMASUNDAR; UDUPA, 2003). Assim, há um acúmulo inicial de peptídeos na superfície da membrana, resultante da interação iônica dos fosfolípidios da membrana com o grupo C-terminal da nisina. Esses peptídeos induzem à uma mudança no potencial de membrana da célula alvo. Em seguida, os peptídeos unem-se à porção transmembrânica, formando poros que causam

inibição do transporte de aminoácidos e efluxo de substâncias de baixo peso molecular, como íons e ATP (McAULIFFE et al., 1998).

Praticamente todo o ATP é hidrolisado na tentativa da manutenção da força próton - motriz. O transporte ativo de aminoácidos cessa e os aminoácidos de reserva são liberados da célula pelos poros formados. Esse distúrbio primário provavelmente gera outras desordens como lise celular (GARCERÁ et al., 1993).

No caso de esporos, a ação bacteriostática deve-se ao resíduo de aminoácido deidroalanina, localizado na quinta posição da molécula de nisina. Este aminoácido liga-se aos grupos sulfidril presentes na membrana dos esporos recém germinados, inibindo as etapas posteriores do processo de formação de outras células (ASADUZZAMAN; SONOMOTO, 2009).

A nisina comercial (Danisco®) recebe o nome de Nisaplin®, sendo uma nisina do tipo A (constituída de cerca de 74,70% de cloreto de sódio, 17,12% de proteína, 1,7% de umidade e 59,30% de carboidratos). No Brasil, é registrada no Ministério da Saúde sob nº 4.7076.0345.001-1, sendo liberada para uso como conservador alimentício pela Resolução 04/88 – CNS/MS, Portaria 146/96 – MAPA, sob a codificação INS 234. De acordo com o fabricante, a concentração mínima de nisina contida em 1mg de Nisaplin® é de 1000IU (“*International Units*” ou Unidades Internacionais), ou seja, 1UI/g de nisina equivale à 0,025µg de nisina, o que significa que em 100 mg de Nisaplin® há 2,5 mg de nisina (SCHULZ et al., 2003).

Foi utilizada em alimentos pela primeira vez em 1951 por Hirsch, com o objetivo de inibir o estufamento em estocagem de queijo suíço, provocado *Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum*. Na ocasião, o pesquisador utilizou linhagens de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* para sua produção (DELVES-BROUGHTON, 2005, ROBERTS; ZOTTOLA; MICKAY, 1992).

Desde então tem sido bastante utilizada associada à outro (s) método (s) de conservação, mostrando-se eficiente principalmente na inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* (FANG; LIN, 1994; FERREIRA; LUND, 1996; CAI et al., 1997; DAVIES et al., 1997; RODRIGUEZ et al., 1997; SZABO; CAHILL, 1998; THOMAS et al., 1998; NILSSON et al., 2000), *Bacillus cereus* e seus esporos (THOMAS et al., 1998; WANDLING et al., 1999; POL et al., 2000), *Lactobacillus* (DAVIES et al., 1999; CHOI; PARK, 2000), *Staphylococcus aureus* (ZOTTOLA et al., 1994, SOBRINO-LÓPEZ; BELLOSO, 2006) e Clostrídios (HURST, 1981; RAYMAN; ARIS; HURST, 1981; FLEMING et al., 1985; DE VUYST; VANDAMME, 1994; WESSELS et al., 1998)

De acordo com Cleveland et al. (2001) e Schulz (2003), a nisina tem aplicação em diversos alimentos, como: leite, queijo, produtos lácteos, tomates e outros vegetais enlatados, sopas enlatadas, maionese e alimentos infantis, havendo algumas limitações de uso em carnes.

Em razão de sua natureza peptídica, a nisina é inibida em presença de proteases. A glutathione (GSH) é um tripeptídeo formado por glutamina, cisteína e glicina, estando presente nas células de mamíferos, em maior concentração em carnes bovinas cruas. Nestas células, atua como catalisadora de reações antioxidantes em presença do oxigênio reativo minimizando a formação de radicais livres (BRAY; TAYLOR, 1993). Porém, quando a nisina é adicionada, há a formação de um complexo envolvendo três moléculas de glutathione e uma molécula de nisina em uma reação catalisada pela glutathione S-transferase. Esta complexação reduz fortemente a atividade da nisina (ROSE et al., 2002).

Apesar disso, Cutter e Siragusa (1994) mostraram que o uso de uma solução contendo 5.000 UI/g de nisina (125mg/kg de nisina) em spray foi efetivo na sanitização de carcaças bovinas inoculadas com 4 log₁₀ UFC/cm² de *Brochothrix thermosphacta*, *Carnobacterium divergens* e *L.innocua*, tendo reduzido esta população para 1,8 a 3,5 log₁₀ UFC/cm² no primeiro dia de uso e para 2,0 a 3,6 log₁₀UFC/cm² após 1 dia de armazenamento a 4°C.

Após inoculação de 10^3 UFC/g de *Listeria monocytogenes* em carne crua de búfalo, Pawar et al. (2000) verificaram que houve uma redução de 2,4 \log_{10} ciclos na população deste micro-organismo com a adição de 800 UI/g de nisina (20mg/kg de nisina) e 2% de cloreto de sódio, após 16 dias de armazenamento da carne à 4°C. Estes autores repetiram o estudo em temperatura abusiva à 37°C e observaram que o efeito foi menos pronunciado, porém igualmente efetivo, concluindo que a adição de 2% de cloreto de sódio potencializou a ação bacteriostática da nisina em ambas as temperaturas.

Diversos estudos comprovam a efetividade da nisina em produtos cárneos cozidos, porém são requeridas doses mais elevadas das utilizadas em derivados lácteos, devido ao fato destes produtos geralmente apresentarem pH acima de sua faixa ótima de atuação, entre 2 e 6,0 (RAYMAN; MALIK; HURST, 1983), dificuldade de homogeneização no produto em razão da baixa solubilidade destes, interação com os fosfolipídios presentes na carne (DE VUYST; VANDAMME, 1994) e a alta concentração de lipídios (DAVIES et al., 1999).

Ao avaliarem o efeito da adição de nisina em lombo de suíno cozido, Fang e Lin (1994) verificaram que 10.000IU/mL de nisina (250mg/kg de nisina) inibiram o crescimento de *Listeria monocytogenes*, porém esta concentração não foi capaz de inibir o crescimento de *Pseudomonas fragi*, sendo possível a inibição de ambos os micro-organismos quando esta dosagem de nisina foi associada à atmosfera modificada (nas concentrações de 100% de CO₂ e em mistura de 80% de CO₂ e 20% de O₂), sendo mais efetivas quando o produto foi mantido à 4°C quando comparado à 20°C.

O uso combinado de EDTA, citrato ou lactato (agentes quelantes) e 2000 UI/g de nisina (50mg/kg de nisina) mostrou-se bastante efetivo no controle de bactérias Gram-negativas, como *Salmonella typhimurium* e *E.coli* O157:H7 em embalagens com atmosfera modificada utilizada em produtos cárneos (CUTTER; SIRAGUSA et al., 1994).

Cutter e Siragusa (1998) relataram que a nisina mostrou-se bastante efetiva na inibição de *Listeria monocytogenes* Scott A, *Lactobacillus* spp e *Brochothrix thermosphacta*, quando adicionada em salsichas tipo Frankfurt e mortadelas tipo Bolonha na concentração de 200 a 400 UI/g de Nisaplin™ (5 a 10mg/kg de nisina).

A combinação de 4.000 UI/g (100mg/kg de nisina), 350MPa de pressão hidrostática e 1% de glucona delta lactona estendeu a vida de prateleira da carne de frango (YUSTE et al., 1998).

O uso de 1000 IU/mL de nisina (25mg/kg de nisina) e calor (60 a 65°C) inibiu o surgimento de *Listeria monocytogenes* em lagostas (BUDU-AMOAKO et al., 1999).

POL et al (2000) mostrou que havia efeito sinérgico da nisina com luz pulsada, em um experimento “*in vitro*” utilizando 600 IU/mL de nisina ou (15 mg/kg de nisina) e 16,7 kV/cm com 100µs de duração de luz pulsada sobre *Bacillus cereus*.

A concentração de 4.000 UI/g de nisina (100mg/kg de nisina) reduziu em 1 \log_{10} (90%) o crescimento de esporos de *Clostridium perfringens* (ATCC 3584) em tripas naturais de suíno previamente irradiadas com 10KGy (WIJNKER et al., 2011).

Apesar desses estudos mostrarem a necessidade do uso de concentrações maiores de nisina em carnes e produtos cárneos, a legislação brasileira e internacional prevê o uso da nisina apenas em salsichas, na concentração máxima de 12,5 mg/kg de nisina (500UI/g) para inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes*, sendo o Brasil o país pioneiro na aprovação desta regulamentação (SCHULZ et al., 2003).

As concentrações permitidas pela legislação brasileira e pela legislação de cada país, bem como os alimentos em que a nisina pode ser utilizada como bioconservador são vistos na Tabela 6.

Tabela 6. Países que permitem o uso de nisina como bioconservador

PAÍS	ALIMENTOS	NÍVEL MÁXIMO PERMITIDO PARA NISINA (UI/g)
Argentina	Queijo processado	500
Austrália	Queijo, queijo processado e tomates enlatados	sem limite
Bélgica	Queijo	100
Brasil	Queijo, vegetais enlatados e salsichas	500
Estados Unidos	Queijo processado e queijo pasteurizado	10.000
França	Queijo processado	sem limite
Holanda	Queijos processado, industrializado e ralado	800
Inglaterra	Queijo, alimentos enlatados e creme	sem limite
Itália	Queijo	500
México	Sem descrição	500
Peru	Sem descrição	sem limite
Rússia	Queijo processado dietético e vegetal enlatados	8.000

Fonte: Cleveland et al., 2001

A regulamentação para uso de um aditivo alimentar baseia-se fundamentalmente no tipo de alimento a ser aplicado e da justificativa de sua utilização. A autorização para o uso é concedida mediante a publicação de resultados comprobatórios de sua eficácia através de pesquisas científicas ou por relatos históricos de uso que atestem sua não toxicidade à seres humanos (FIELDS, 1996).

Os trabalhos supracitados além de outros existentes comprovam a possibilidade do uso da nisina na redução da microbiota em carnes cruas e inibição do crescimento de diversos micro-organismos em derivados cárneos cozidos, o que permitiria reduzir e/ou eliminar a utilização dos sais de cura, potencialmente prejudiciais à saúde, de forma a garantir a segurança dos produtos e atender à nova demanda por alimentos mais saudáveis, livres de aditivos químicos.

A nisina foi reconhecida como aditivo alimentar pela Organização de Alimentos e Agricultura e Organização Mundial de Saúde (FAO;OMS) em 1969, com o limite máximo de ingestão de 33.000 UI/kg de peso corpóreo (SCHULZ et al., 2003). É atualmente a única bacteriocina disponível comercialmente para conservação de alimentos, sendo produzida através de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, um micro-organismo naturalmente presente em processos fermentativos naturais, não causando portanto, nenhum efeito adverso ao organismo humano (CLEVELAND et al., 2001).

A observação da eficácia na prevenção da contaminação microbiana em alimentos, remeteu à idéia de que a nisina também poderia ser utilizada em aplicações clínicas. Assim, estudos mostraram que a nisina foi eficaz no tratamento de diversas doenças em animais e humanos, tais como: dermatites atópicas (VALENTA; BERNKOP-SCHNÜRCH; RIGLER, 1996), úlceras e infecções no cólon, principalmente em pacientes com imunodeficiência (DUBOIS, 1995; SAKAMOTO; IGARASHI; KIMURA, 2001), mastite bovina (CAO et al., 2007) e mastite humana causada por Estafilococos (FERNÁNDEZ et al., 2008), infecções do

trato respiratório oriundas de *Staphylococcus aureus* (DE KWAADSTENIET; DOESCHATE; DICKS, 2009) e até mesmo na prevenção de cáries (TONG et al., 2010).

2.8 Métodos Sensoriais

Existem diversos métodos que podem ser empregados para se analisar sensorialmente um determinado produto.

A escolha de um método específico irá depender do que se deseja obter como resposta. Caso se deseje conhecer a aceitabilidade e /ou preferência do consumidor, por exemplo, o ideal é que sejam utilizados métodos sensoriais com testes afetivos.

Quando se quer verificar se há diferença perceptível entre o produto que se quer testar e os similares de mercado, utilizam-se os testes discriminatórios ou de diferença.

Porém, quando o objetivo é avaliar as principais diferenças e suas intensidades entre os diferentes produtos, deve-se utilizar análises descritivas (MINIM, 2010).

Os métodos afetivos demonstram a percepção dos consumidores quanto aos atributos de cor, aroma, sabor e consistência, não necessitando de treinamento de provadores, sendo portanto utilizados por indústrias de alimentos quando há desenvolvimento de novos produtos e/ou na melhoria dos já existentes ou quando há mudanças nas formulações e/ou processos, podendo-se utilizar os testes de aceitação e ordenação de preferências (CARNEIRO; MINIM, 2006).

Os testes de aceitação são utilizados para verificar o quanto o consumidor gosta ou desgosta de um determinado produto analisado. A escala hedônica é aplicada nestes casos, podendo ser em escalas verbais (de 7 e 9 pontos, sendo atribuído 1 para desgostei muitíssimo e 7 ou 9 para gostei muitíssimo), escalas faciais (muito usadas quando o público alvo são crianças ou indivíduos analfabetos), não estruturada, com uma linha demarcada no extremo esquerdo com o termo “desgostei extremamente” e no direito “gostei extremamente”, não sendo utilizado valor numérico (MINIM, p.67, 2010).

Segundo Guerrero (1999) na aplicação destes testes devem ser considerados o local de aplicação dos testes, a representatividade dos consumidores, as características do teste (quantidade de perguntas, forma de apresentação destas questões e confiabilidade do teste) assim como o número de amostras oferecidas ao consumidor de modo a evitar fadiga, a codificação das amostras e as informações que a apresentem ao consumidor, além da consideração dos erros inerentes que são muitas vezes incontroláveis, como a atitude do consumidor em relação ao questionário a ele aplicado.

Os métodos discriminatórios são de fácil interpretação, exigem pouco tempo, possuem baixo custo de aplicação e podem estabelecer diferenças qualitativas e/ou quantitativas entre cada uma das amostras (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999).

Os métodos descritivos caracterizam e descrevem as propriedades sensoriais de um produto, utilizando uma linguagem técnica. Um exemplo é a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ). A aplicação destes métodos exigem a participação de uma equipe bem treinada, levando a um maior tempo de análise, o que gera um alto custo (MINIM, 2010).

De acordo com Minim (2010), a maioria dos testes sensoriais (exceto os descritivos) devem ser aplicados individualmente em cabines de coloração clara a fim de facilitar a observação da aparência do produto avaliado, sendo ainda providas de luz branca (quando se deseja avaliar atributos de cor e aspecto visual) e colorida (vermelha, verde ou azul, quando ao contrário, se deseja mascarar as diferenças visuais entre os produtos analisados). Os provadores devem receber, além de uma bandeja contendo as amostras, um copo com água para enxágue da boca, lápis, borracha e o questionário para avaliação das amostras e biscoitos de água e sal para limpar o palato. A quantidade de amostra a ser oferecida deve ser suficiente para a avaliação dos provadores, sendo recomendada em caso de produtos sólidos e cremosos,

amostras contendo cerca de 25g. Com relação à quantidade de provadores necessários para a realização dos testes, é recomendável um mínimo de 100 provadores quando os testes são realizados em locais centrais como supermercados, shoppings e escolas. O interessante da realização dos testes em locais centrais é que a avaliação é feita diretamente com os potenciais consumidores do produto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O processamento dos patês foi realizado na planta de Processamento de Carnes do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As análises de pH, composição química, teor de cloretos e minerais (Na^+ , K^+ e Ca^{++}) e perfil em ácidos graxos foram conduzidas no Laboratório de Análise de Alimentos e Bebidas (LAAB), assim como as análises microbiológicas no Laboratório de Microbiologia, ambos do Departamento de Tecnologia de Alimentos. A análise de atividade de água foi feita no Laboratório de Ciências Veterinárias da Embrapa Agrobiologia, enquanto as análises para verificação da oxidação lipídica (TBARS) foi realizada na Embrapa Agroindústria de Alimentos (CTAA).

3.1 Origem das Matérias Primas, Condimentos e Aditivos

A nisina utilizada foi a comercial Nisaplin™, da empresa Danisco S/A (Langebrogade, Copenhagen, Dinamarca.). Os filezinhos de frango da marca Perdigão (Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil), assim como o vinho tinto seco (PÉRGOLA), o leite integral (ELEGÊ), a farinha de linhaça (ARMA ZEN), o sal light (CISNE), o azeite de oliva extra virgem (BORGES), o extrato de soja (FUMEL), o açúcar refinado (UNIÃO), o alho granulado, a cebola em pó, a pimenta branca em pó (marcas comerciais não esterilizadas) e o fermento láctico Biorich (Chr Hansen®, Boge Allé, Horsholm, Dinamarca) foram adquiridos no comércio da região (Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil). O antioxidante ácido ascórbico foi da Vetec® e o fixador de cor da IBRAC - Indústria Brasileira de Aditivos e Condimentos, LTDA (Rio Claro, São Paulo, Brasil) O polifosfato de sódio (201/12 DR6617/5), o sal de cura (101), a noz moscada em pó (60-616-04-3), o corante carmin cochonilha (DR4554/2) e a carragena (MBF-721) foram da empresa Duas Rodas Industrial LTDA (Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brasil) e as embalagens de vidro com capacidade para $100\pm 1\text{g}$ e as tampas metálicas de rosca da Wheaton Brasil (São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil).

Também foram utilizadas, para avaliação comparativa, amostras comerciais de patês provenientes de empresas líderes no mercado de produtos cárneos, embaladas em vidro (CV) e em bisnaga (CB) e em lata (CL) nas análises de composição química, perfil em ácidos graxos e nas análises sensoriais (CV e CB).

3.2 Formulações Desenvolvidas para os Patês Teste

Foram desenvolvidas cinco formulações de patê de frango sendo três com diferentes concentrações de nisina (100, 300 e 500 mg/kg (ppm), denominadas de F1, F3 e F5 respectivamente e duas formulações controle, FC (sem conservadores) e SC (adicionada de 150 mg/kg (ppm) de sal de cura). Os ingredientes em porcentagem utilizados nas formulações são relacionados na Tabela 7.

Tabela 7. Formulações desenvolvidas para os patês

INGREDIENTES	FORMULAÇÕES (Tratamentos/Amostras)*				
	FC(%)	SC(%)	F1(%)	F3(%)	F5(%)
Filezinho de frango	36,83	36,55	36,67	36,29	36,08
Iogurte com leite integral	22,82	23,32	22,70	22,55	22,37
Azeite de oliva extra virgem	14,75	14,61	14,71	14,62	14,46
Água	14,75	14,61	14,71	14,62	14,46
Suco de limão	3,686	3,652	3,673	3,643	3,614
Vinho tinto seco	2,212	2,191	2,204	2,186	2,168
Sal light	1,106	1,096	1,102	1,093	1,084
Extrato de soja	0,737	0,732	0,735	0,729	0,723
Carragena	0,737	0,732	0,735	0,729	0,723
Polifosfato de sódio	0,737	0,732	0,735	0,729	0,723
Nisaplin™ (nisina tipo A)	-	-	0,400	1,200	2,000
Alho granulado	0,369	0,366	0,367	0,364	0,361
Açúcar refinado	0,369	0,366	0,367	0,364	0,361
Farinha de linhaça dourada	0,369	0,366	0,367	0,364	0,361
Cebola em pó	0,221	0,220	0,220	0,219	0,219
Sal de cura	-	0,150	-	-	-
Corante carmim cochonilha	0,118	0,117	0,118	0,117	0,116
Antioxidante ácido ascórbico	0,073	0,073	0,073	0,073	0,072
Pimenta branca em pó	0,073	0,073	0,073	0,073	0,072
Noz moscada em pó	0,043	0,043	0,042	0,042	0,042
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

*FC – Formulação controle, SC – Formulação com 150 mg/kg de sal de cura, F1 – Formulação com 100mg/kg de nisina, F3 – Formulação com 300mg/kg de nisina, F5 – Formulação com 500mg/kg de nisina.

3.2.1 Elaboração dos patês

As formulações foram processadas em batelada, identificadas com um número de lote e a data de fabricação. Cada pote de 100±1g representou uma amostra de seu lote correspondente. Para a realização de cada análise, foram utilizadas 3 amostras de bateladas distintas com 3 repetições para cada uma, totalizando 9 leituras para cada formulação, a fim de que houvesse repetibilidade dos dados. Todos os patês formulados bem como os patês comerciais foram mantidos sob as mesmas condições de armazenamento (em refrigerador, com temperatura de 8 ± 2°C e umidade relativa de 75 ± 5%, medidos com auxílio de termohigrômetro digital). O iogurte natural foi feito em iogurteira e o cozimento prévio dos filezinhos de frango em vaporeira (60 minutos). Para a elaboração dos patês, utilizou-se um multiprocessador de alimentos verificando-se a temperatura da mistura (com termômetro digital de haste metálica) que deveria estar no máximo à 15°C para evitar quebra da emulsão cárnea. Após processados, os patês foram acondicionados em embalagens de vidro de 100±1g previamente lavadas e esterilizadas a 121°C/15 minutos, submetidos à exaustão (100 ± 5°C/10 minutos) e em seguida, cozidos à 80 ± 5°C/30 minutos, utilizando quatro potes testemunha, distribuídos em forma de cruz para verificação da temperatura interna com auxílio de

termômetro de vidro (de modo a alcançar 75°C no interior do produto) sendo resfriados imediatamente em banho de gelo à $4 \pm 2^{\circ}\text{C}/45 \text{ min}$, mantidos sob refrigeração à $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$ durante 180 dias. Em intervalos regulares os potes foram retirados para análise. A produção dos patês é vista na Figura 10.

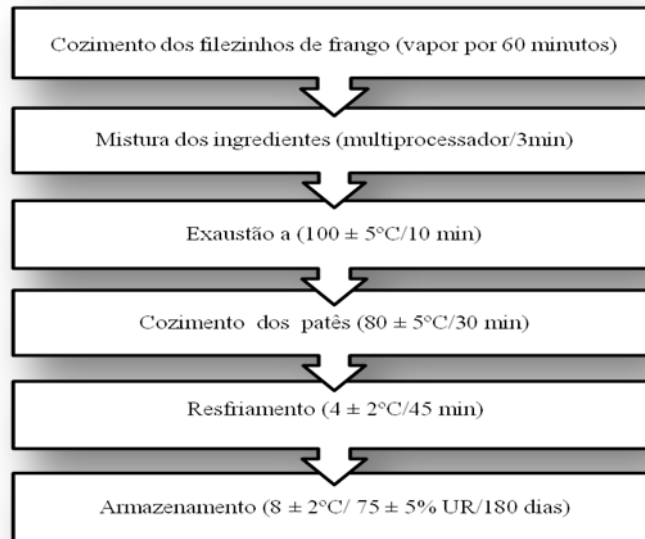


Figura 10. Fluxograma do processo de produção do patê de frango

As fotografias que ilustram as etapas do processamento dos patês são vistas na Figura 11.

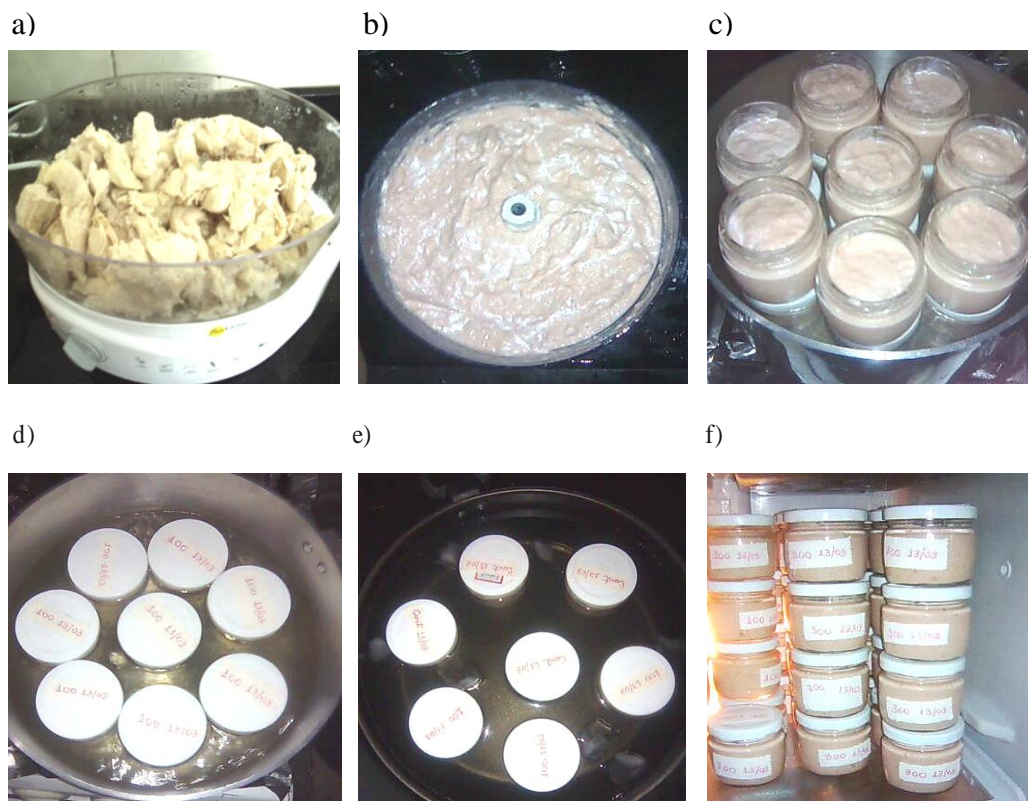


Figura 11. Etapas de processamento do patê: a) cozimento do frango à vapor b) mistura de ingredientes no multiprocessador c) exaustão d) cozimento e) resfriamento em banho de gelo f) armazenamento sob refrigeração.

3.3 Análises Físico- Químicas

3.3.1 Composição química

A umidade foi realizada através da perda de água por dessecação em estufa à 105°C. A determinação de cinzas foi realizada por incineração em mufla a 550°C. O teor de proteínas foi determinado através do método de KJELDAHL para a determinação do nitrogênio total. Para transformação dos resultados em teor de proteína, utilizou-se o fator 6,25. As análises de lipídios foram determinadas utilizando o método de Soxlet em éter de petróleo. Estas determinações foram realizadas de acordo com métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes (BRASIL, 1999).

O teor de carboidratos foi obtido por diferença e o valor calórico foi determinado através do uso dos coeficientes de Atwater (1963), aceito por BRASIL (2003), que estabelece o valor 4,0 para proteína e carboidratos e 9,0 para lipídios, sendo:

$$\text{Valor calórico (Kcal)} = (\% \text{ proteínas} \times 4) + (\% \text{ carboidratos} \times 4) + (\% \text{ lipídios} \times 9)$$

3.3.2 Teor de cloretos e minerais (Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺)

A análise de cloretos foi realizada pelo método de Mohr (1966). O teor de sódio, potássio e cálcio foi determinado com auxílio de fotômetro de chama (ANALYSEZ ® modelo 910 M digital), após realização da análise de cinzas (BRASIL, 1999).

3.3.2.1 Análise estatística

Os dados de composição química, teor de cloretos e minerais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) conforme o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições em que se avaliou 5 formulações de patê como tratamentos (FC, SC, F1, F3 e F5). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade, utilizando-se o sistema estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

3.3.3 pH

Utilizou-se potenciômetro digital DIGIMED®, modelo M DM 20, dotado de eletrodo de vidro combinado, previamente calibrado em soluções tampão em pH 4,00 e 7,00 (BRASIL, 1999).

3.3.4 Atividade de água (Aa)

A atividade de água foi determinada utilizando-se equipamento AquaLab modelo CX – 2, calibrado com água destilada. Foram utilizadas as formulações teste: FC, SC, F1, F3 e F5, bem como as três amostras comerciais CV, CB e CL.

3.3.5 Perfil em ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos foi determinado nos tempos: 1, 90 e 180 dias de armazenamento, para as formulações teste e as amostras comerciais CV, CB e CL.

A metodologia utilizada foi a de extração à frio de BLIGH-DYER (1959).

O perfil em ácidos graxos foi obtido por cromatografia gasosa (CG), seguindo a metodologia de Saldanha et al. (2006). A análise foi realizada em cromatógrafo da marca CHROMPACK, modelo CP 9002, equipado com injetor split (razão do split, 1:50 à 250°C), detector de ionização de chama (FID à 280°C) e coluna capilar constituída 100% de Cianopropilsiloxano CP-SIL 88 (alta polaridade). A temperatura do forno foi inicialmente de 140°C por 5 minutos, elevando-se em seguida a temperatura à uma taxa de 4°C/min, até atingir a temperatura de 240°C, onde permaneceu até a finalização da leitura (cerca de 20 minutos). Utilizou-se H₂ como fase móvel (gás de arraste) e N₂ como fase estacionária, ambos à 30mL/min e ar sintético à 300mL/min de vazão; temperatura do injetor, 250°C; temperatura do detector 280°C e volume injetado de 0,5 µm. Os ácidos graxos foram comparados com os padrões, sendo identificados pelos tempos de retenção e comprimentos equivalentes da cadeia.

3.3.6 Oxidação lipídica (Substâncias Reativas ao Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBARS))

As análises foram realizadas utilizando o Kit Rápido – Método SafTestTM (90.33 AOAC 2001), com adaptações, para a determinação de malonaldeído (AldeSafTM).

As amostras FC, SC, F1, F3 e F5 foram homogeneizadas na própria embalagem, e analisadas em triplicata aos 1, 60, 120 e 180 dias de preparação dos patês.

Para a realização das análises com o Kit AldeSafTM inicialmente foi feita a retirada dos reagentes (reagentes A e B, calibradores, controles e PREP- reagente preparador da amostra) da geladeira, previamente por um período de 2 horas, deixados à temperatura ambiente. Os tubos de ensaio que serviram para os calibradores, controles e amostras, foram identificados e partiu-se para a preparação dos calibradores e controles, onde foram utilizados 400 µL do calibrador (C1, C2, C3, C4 e C5) adicionados de 01 alíquota do reagente A + 01 alíquota do reagente B, tampados e levados ao agitador magnético por exatos 60 segundos. Em seguida esse mesmo procedimento foi realizado para os controles (baixo, médio e alto). Feito esse procedimento, os calibradores e controles foram deixados em temperatura ambiente por 90 minutos para desenvolvimento da cor. Para preparo das amostras foi pesado 1 g de amostra que em seguida foram diluídas em PREP (2 alíquotas em triplicata) e levadas ao agitador magnético. Feito este procedimento, os tubos com as amostras foram colocados no bloco aquecedor por 15 minutos à 40°C devido a presença de ácidos graxos insaturados que poderiam sofrer oxidação em temperaturas mais elevadas. Em seguida foi realizada a filtração à vácuo, com auxílio de membrana. Após a filtração, foram coletadas 400 µL de cada tubo filtrado e estes foram adicionados de uma alíquota do reagente A + uma alíquota do reagente B, tampados e levados ao agitador magnético por 60 segundos. Após completa homogeneização, estes permaneceram em temperatura ambiente por 90 minutos para desenvolvimento da cor.

Finalizando o branco, contendo água destilada, os calibradores e os controles, foram colocados no equipamento Micro Chem II, com filtro de comprimento de onda de 560nm e feita a curva de calibração. Em seguida, as amostras foram lidas e o resultado multiplicado por 4 expresso em mg de malonaldeído/kg.

As fotos do equipamento são vistas na Figura 12.

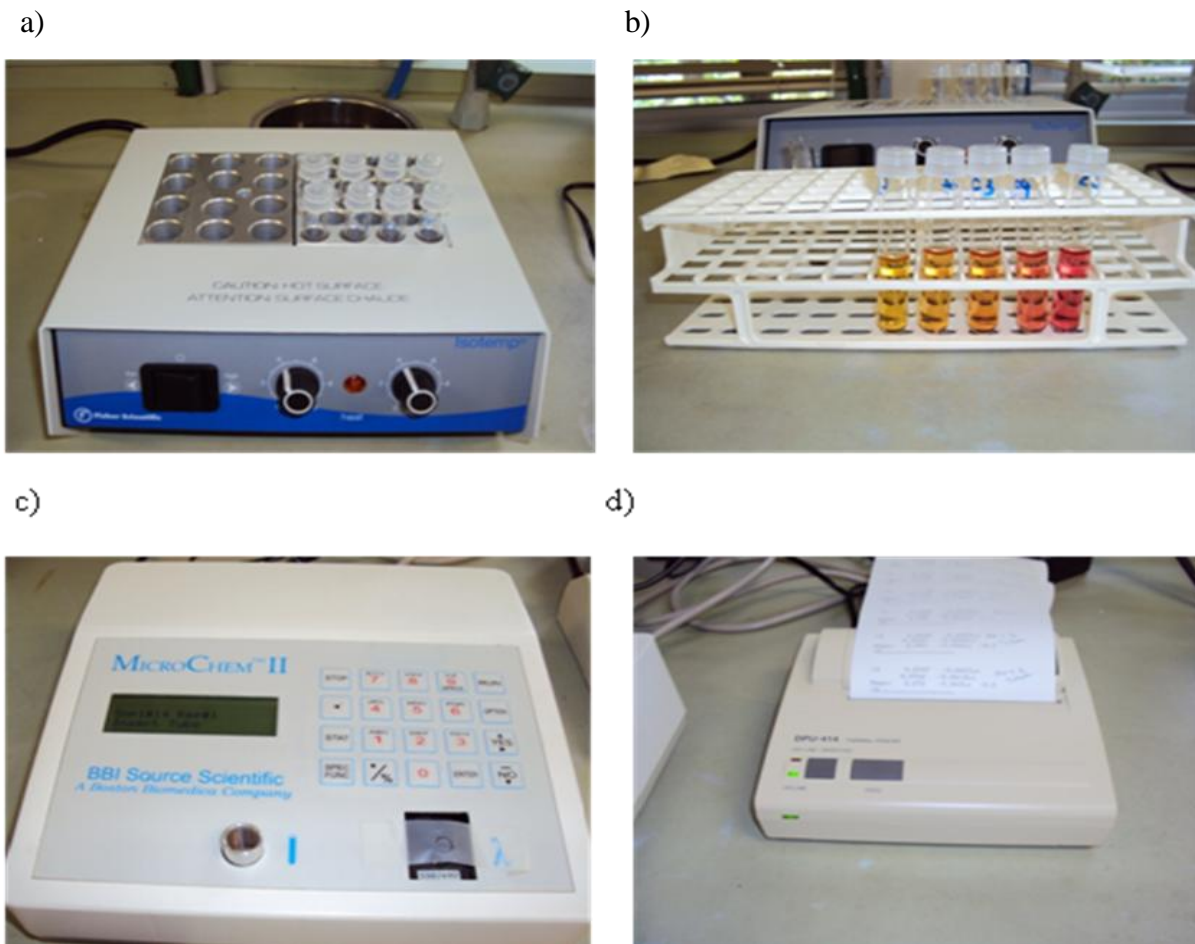


Figura 12. Equipamento para análise de TBARS a) bloco aquecedor com as amostras b) estante com tubos de ensaio contendo reagentes para a curva de calibração c) equipamento MicroChem II para leitura da curva de calibração e amostras d) impressora. Fotos gentilmente cedidas pela Dra Simone Pereira Mathias, 2010.

3.3.6.1 Análise estatística

Os dados de pH e oxidação lipídica (TBARS) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) conforme o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, em esquema fatorial 5x4, correspondendo à combinação entre 5 formulações de patê (FC, SC, F1, F3 e F5) avaliadas em 4 períodos de armazenamento (1, 60, 120 e 180 dias de armazenamento). As médias provenientes das diferentes formulações e entre os períodos de armazenamento foram comparadas pelo teste de Scott-Knott. As análises foram realizadas utilizando-se o sistema estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000) à 5% de probabilidade.

3.4 Análises Microbiológicas

3.4.1 Determinação da vida útil dos patês

As análises microbiológicas para determinação da vida útil das formulações foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa nº 62 de 26 de Agosto de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que oficializa os Métodos Analíticos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Os patês foram mantidos sob refrigeração à $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75\pm 5\%$ e as análises foram

realizadas primeiramente a cada 15 dias durante 180 dias de armazenamento. As análises foram repetidas, aos 1, 30, 60, 90, 120 e 180 dias de armazenamento para confirmação dos resultados. As análises realizadas foram aquelas preconizadas pelos padrões microbiológicos para alimentos, RDC 12 da ANVISA de 02 de Janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) além de determinações indicativas de vida útil tais como: contagem de mesófilos e psicrotóxicos aeróbios, bolores e leveduras e contagem de bactérias lácticas.

3.4.1.1. Análise de *Salmonella* spp.

Foram pesados 25g de cada amostra de patê e depositadas em BagLights[®] de 400mL (PolySilk[®] Interscience, Saint Nom, França), adicionando-se 225mL de água peptonada tamponada a 0,1% p/v (Himedia[®], L.B.S. Marg, Mumbai, Índia) como meio de pré-enriquecimento. A mistura foi homogeneizada em Stomacher (Boitton equipamentos para laboratório, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) por 1 minuto e incubado em BOD a 36°C por 24h. A seguir transferiram-se alíquotas de 0,1 mL para meio Rappaport (Difco[™], Chadwell Heath, Essex, Inglaterra) e 1 mL para meio Selenito cistina (Selenite Cystine Broth Base (Himedia[®]) procedendo-se à incubação em banho maria (Quimis modelo Q-215 M1) à 41±0,5°C por 24h.

A partir de cada um dos tubos de caldo de enriquecimento seletivo foi realizado o isolamento por estriamento com alça de níquel cromo nos meios Hektoen enteric ágar (Himedia[®]) e ágar BPLS (Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol, Lactose Sacarose - MicroMed[®], Isofar, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida todas as placas foram incubadas invertidas por 24h à 36°C em BOD.

3.4.1.2. Enumeração de Coliformes totais e termotolerantes, Estafilococos coagulase positivo, Clostrídios sulfito redutores, Contagem padrão em placas, Bolores e Leveduras e Bactérias lácticas

Vinte e cinco gramas de amostra foram homogeneizadas com 225 mL de solução 0,1% p/v de peptona (Himedia[®]) em Stomacher (Boitton equipamentos para laboratório, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil) por 1 minuto. Prepararam-se diluições decimais sucessivas até 10⁻³ que foram utilizadas para as análises descritas a seguir.

- Coliformes totais e termotolerantes: Para determinação de coliformes empregou-se a técnica do número mais provável (NMP) semeando-se em Caldo Lactosado Lauril Sulfato de Sódio (Himedia[®]), alíquotas de 1 mL em três tubos de três diluições decimais sucessivas totalizando nove tubos. Os tubos foram incubados a 35°C por 48h. Tubos positivos foram confirmados em caldo verde brilhante e caldo EC, incubados a 35±2°C por 48h e em banho maria a 45±0,2°C por 24h, para coliformes totais e termotolerantes respectivamente. O Caldo Lactosado Lauril Sulfato de Sódio inibe o crescimento de outros micro-organismos que não sejam coliformes, em razão de sua composição em fosfatos, atuando como tampão, de modo a impedir sua acidificação. Além disso, o lauril sulfato de sódio é um agente surfactante aniônico que atua na membrana citoplasmática de micro-organismos Gram-positivos, tornando o meio seletivo. O caldo verde brilhante é constituído de bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante). Estes componentes inibem o crescimento de micro-organismos Gram-positivos.

- Estafilococos coagulase positivo: A contagem de estafilococos coagulase positivo foi realizada por inoculação em superfície (0,1mL) em meio Baird Parker (Himedia[®]) adicionado

de 20% de gema de ovo com telurito de potássio (New Prov, Pinhais, Paraná, Brasil). As placas foram incubadas invertidas em estufa à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48h. O meio de Baird Parker é constituído de telurito de potássio, cloreto de lítio e glicina. A formação de colônias negras em razão da redução aeróbica e anaeróbica do telurito de potássio indica presença de *Staphylococcus* spp. A suplementação do meio com gema de ovo permite a verificação da atividade proteolítica e lipolítica do micro-organismo, através da formação de um halo de transparência seguido de um halo de precipitação ao redor da colônia negra. Placas contendo colônias suspeitas devem ser submetidas ao teste de coagulase para verificar a capacidade de coagular o plasma de coelho, atividade relacionada à capacidade de produzir enterotoxina. O resultado foi expresso em UFC/g;

- Clostrídios sulfito redutores: Foram determinados por inoculação em profundidade (1mL) utilizando meio Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina - SPS (MicroMed[®]) em placas com sobrecamada do mesmo meio e em tubos utilizando selo de aneroiose (Vaspar). Seguiu-se a incubação em estufa à $36^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. A confirmação foi feita por meio da visualização de colônias negras formadas no meio SPS em razão da redução de sulfito a sulfeto que reage com o citrato de amônio e ferro⁺³ originando precipitado negro. O resultado foi expresso em UFC/g;
- Contagem de mesófilos e psicrotróficos aeróbios: Foi realizada por plaqueamento em superfície e profundidade em meio Ágar Contagem (PCA, Himedia[®]) com incubação à $10^{\circ}\text{C}/5$ dias e à $36^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ para micro-organismos psicrofilos aeróbios e mesófilos aeróbios respectivamente. O resultado foi expresso em UFC/g;
- Bolores e Leveduras: Determinou-se por plaqueamento em superfície em meio Ágar Batata Dextrose 2% (Himedia[®]) acidificado a pH 3,5 com ácido tartárico estéril à 10% (Vetec[®], Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil). O objetivo da adição do ácido tartárico é inibir o crescimento de bactérias através da acidificação do meio. A incubação foi realizada em estufa à $30^{\circ}\text{C}/5$ a 7 dias. O resultado foi expresso em UFC/g;
- Bactérias lácticas: A contagem de bactérias lácticas foi realizada por plaqueamento em profundidade com sobrecamada utilizando Ágar MRS Lactobacilos – Man, Rogosa e Sharpe (Synth[®], Diadema, São Paulo, Brasil) adicionando de 1% de Tween 80 (Vetec[®]). O resultado foi expresso em UFC/g.

3.4.1.2.1. Coloração de Gram

As colônias suspeitas foram retiradas das placas cuidadosamente com auxílio de alça de níquel-cromo e preparado um esfregaço com 1 gota de água destilada em lâmina de vidro. Em seguida as lâminas foram secas rapidamente em chama de bico de Bunsen. O esfregaço foi corado com cristal violeta, permanecendo por 1 minuto. Após este período, o corante foi desprezado e o esfregaço coberto com lugol, permanecendo por mais 1 minuto. Lavou-se em água destilada e cobriu-o com álcool absoluto por 1 segundo e em seguida, lavou-se em água destilada novamente. Corou-se com safranina por 30 segundos. Após este procedimento, as lâminas com o esfregaço foram lavadas em água destilada e secas em chama de bico de Bunsen, sendo levadas ao microscópio óptico (BIOVAL modelo L2000A), e observadas em objetiva de imersão (100X). Células coradas em azul são classificadas como Gram - positivas e as coradas em vermelho como Gram - negativas (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992).

3.4.1.2.2. Prova da Catalase

As colônias Gram positivas suspeitas provenientes do meio Ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) foram submetidas à prova da catalase sendo retiradas das placas com auxílio de alça de níquel cromo, depositadas em lâminas (duplicata) e adicionadas de uma gota de peróxido de hidrogênio (Laborclin, Interlab, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 3% em cada lâmina para verificar a formação de bolhas pela decomposição do peróxido de hidrogênio e liberação de oxigênio (teste positivo) ou não (teste negativo). Catalase positiva indica presença de *Bacillus* spp e catalase negativa a presença de *Clostridium* spp (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992).

3.4.2 Teste microbiológico qualitativo em temperatura abusiva de 36°C e 55°C

Apesar do patê ser um produto mantido sob refrigeração nas formulações teste e na maioria das formulações comerciais, o objetivo de se realizar este teste foi observar de forma acelerada, o comportamento dos micro-organismos em presença de 150 mg/kg de sal de cura e da nisina em diferentes concentrações. Este teste foi realizado no patê e também nos condimentos a fim de verificar a contaminação com micro-organismos esporogêneos.

O teste microbiológico qualitativo à 36°C e 55°C foi realizado de acordo com a APHA (2001) – *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* para determinação de esterilidade comercial de produtos de baixa acidez (pH>4,5). Inicialmente, os potes de patê foram mantidos à 36°C por 10 dias e 55°C por 7 dias em BOD. Após estes períodos, 2g de cada amostra foram introduzidos em tubos contendo meio Carne Cozida (Himedia[®]) + vaspar e caldo dextrose púrpura de bromocresol (PBC - preparados utilizando 5g de meio de extrato de carne (Himedia[®]), 10g de caldo triptona (Himedia[®]), 5g de glicose P.A (Vetec[®]), 1 L de água destilada e 4 mL de solução de bromocresol à 1% (Vetec[®]).

Estes tubos em duplicata, em meios de Caldo de Carne Cozida e em caldo PBC foram mantidos em BOD à 36°C/10 dias e 55°C/4 dias, respectivamente.

Após este período, os tubos contendo caldo de carne visivelmente contaminados (presença de gás e turbidez), foram estriados em placas contendo ágar + extrato de fígado em pó (preparados utilizando 15g de meio ágar-ágar (Himedia[®]) + 5g de extrato de fígado em pó (Himedia[®]) em 1L de água destilada). As placas foram incubadas invertidas à 36°C/4 dias em BOD em aerobiose e anaerobiose (jarras de anaerobiose Permution modelo JA0401, Curitiba, Paraná, Brasil e gerador de anaerobiose (AnaeroGen[™], Oxoid[©]).

Os tubos contendo caldo PBC visivelmente contaminados (transformação da coloração púrpura em amarela) foram estriados em placas com meio Ágar Nutriente Manganês (ANMn), preparados com 15g de ágar nutriente (Himedia[®]) + 300mg de sulfato de manganês anidro (Vetec[®]) em 1L de água destilada). As placas foram incubadas invertidas em aerobiose à 36°C/10 dias em BOD.

Após este período, foi realizado o esfregaço de algumas colônias, sendo coradas pelo método de Gram e observadas ao microscópio óptico em objetiva de imersão, além de realização de prova da catalase.

Estes procedimentos (coloração de Gram e prova da catalase) foram realizados tanto para as colônias presentes no meio ágar+extrato de fígado em pó, como para as presentes no meio ANMn.

3.4.3 Challenge testing com *Clostridium botulinum* em temperatura abusiva de 30°C

O teste de desafio (*Challenge testing*) visa simular sob condições controladas, o comportamento de um produto industrializado durante suas etapas de processamento,

distribuição e armazenamento, quando este é inoculado com um ou mais micro-organismos de interesse (NOTERMANS et al., 1993).

Neste caso, foi realizado para verificação da efetiva ação inibidora da nisina no patê em diferentes concentrações (F1, F3 e F5) frente à inoculação de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397). As formulações contendo nisina foram comparadas às formulações sem conservadores (C), sem conservadores inoculado (Ci) e com 150 mg/kg de sal de cura (SC). Para a esporulação do *Clostridium botulinum* foi utilizada a metodologia de Schmidt (1962).

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, utilizando os equipamentos de proteção individual (EPI's) necessários como: luvas de látex, óculos de acrílico, máscara e touca, além de jaleco de manga comprida.

A ampola liofilizada foi transferida para tubos em triplicata contendo Reinforced Clostridium Medium (Oxoid[®]) previamente esterilizados e fervidos (para desaeração). Em seguida, foram incubados em anaerobiose à 36°C por 48h. Após 48h, transferiu-se 0,1mL para tubos contendo caldo de carne cozida (Himedia[®]), previamente fervido. Incubou-se novamente à 36°C/48h em anaerobiose. Repetiu-se o último procedimento. Transferiu-se 1mL do último crescimento em caldo de carne para tubos contendo 9 mL do meio de esporulação de Schmidt (1962) previamente desaerado. Incubou-se em seguida por 8h à 30°C. Transferiu-se todo o conteúdo do meio de esporulação (10mL) para garrafas de vidro contendo 90 mL do meio de esporulação previamente desaerado. Incubou-se por 4 dias à 30°C. Em seguida, realizou-se coloração de Gram para verificar a presença de esporos. Adicionou-se o conteúdo das garrafas em frasco de centrífuga (SIGMA modelo 2K15, Osterode am Harz, Alemanha) previamente esterilizado, centrifugando-se à 3.100 x g por 15 minutos à 10°C. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 10 mL de água destilada estéril, distribuindo-se em seguida em microtubos, de modo a conter 1 mL de suspensão de esporos em cada tubo. Os microtubos foram mantidos sob congelamento a -20°C. No momento do uso, um tubo contendo 1 mL foi transferido para um tubo contendo 9 mL de água peptonada para realizar a diluição 10⁻¹. Aplicou-se choque térmico em banho maria a 80°C por 10 minutos, resfriando-o em seguida em banho de gelo por 15 minutos. Usou-se um tubo testemunha para verificação da temperatura interna do tubo. Preparou-se diluições subsequentes até 10⁻⁷ e em seguida, realizou-se a contagem de esporos por plaqueamento em profundidade em meio SPS e sobrecamada, em placas incubadas em BOD à 36°C/48h. Após contagem das placas, determinou-se o título dos esporos (número de esporos contidos em 1mL de suspensão).

As formulações de patê foram elaboradas e identificadas como: C (controle, sem conservadores não inoculado), Ci (controle, sem conservadores inoculado), SC (150 mg/kg de sal de cura), F1 (100 mg/kg de nisina), F3 (300 mg/kg de nisina) e F5 (500 mg/kg de nisina), sendo preparados 5 potes para cada tratamento. Os patês foram inoculados com a suspensão de esporos de *C. botulinum* de modo a conter aproximadamente 1 x 10² esporos por grama. Em cada pote de patê foi inoculado 1mL da suspensão contendo aproximadamente 1x10⁴ por mL distribuindo-a em cinco pontos distintos com auxílio de seringa descartável de 3 mL.

O procedimento de inoculação da suspensão de esporos foi realizado entre as etapas de exaustão e cozimento do produto.

Os patês foram mantidos em BOD a 30°C por até 28 dias, sendo observados diariamente para verificação de alterações visuais, retirando-se unidades de cada tratamento para verificação da presença de clostrídios em meio SPS aos 7, 10, 14, 21 e 28 dias.

3.5 Análises Sensoriais

Foi realizado um teste de localização central no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,

onde transitam nos arredores, discentes de diversos cursos, docentes e funcionários técnico-administrativos deste e do Departamento de Engenharia Química e do Instituto de Tecnologia.

Primeiramente, foi distribuído um questionário para cadastro dos consumidores dispostos a participar da pesquisa com o objetivo de poupar tempo nas datas previstas para os testes, contactando-os via telefone ou e-mail (ANEXO A). Neste questionário também foi explicado o objetivo da realização dos testes. Nas datas dos testes, cartazes foram afixados nos arredores do laboratório de análises sensorial a fim de lembrar os participantes das datas, horários e local dos mesmos.

Após realização das análises microbiológicas prévias para pesquisa de *Salmonella* spp, Clostrídio sulfito redutores, Estafilococos coagulase positivo e Coliformes termotolerantes de acordo com o preconizado pela RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001) e verificação de que as amostras encontravam-se aptas ao consumo, foram iniciados os testes sensoriais.

O projeto de pesquisa foi previamente protocolado na Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ/COMEP-UFRRJ, uma vez que haveria a participação direta de humanos na mesma (nº de protocolo: 012207 datado de 03 de Novembro de 2010).

Os testes foram realizados de acordo com a norma técnica NBR 14141 da ABNT (1998).

Todos os consumidores declararam que consumiam patê pelo menos uma vez por mês.

No primeiro dia dos testes, foi entregue aos participantes um termo de responsabilidade para que atestassem o conhecimento dos objetivos da realização dos mesmos, além de autorizarem por escrito a divulgação de suas opiniões (ANEXO B).

Foram aplicados testes de comparação múltipla, aceitação em escala hedônica de 9 pontos e intenção de compra, contando com a participação de 100 voluntários em cada um, sendo realizados em dias alternados, a fim de evitar fadiga dos provadores.

À cada teste, foi-lhes entregue uma ficha específica para avaliação das amostras (ANEXOS C, D e E), bem como um copo com água e um biscoito *Cream Cracker* para serem consumidos entre uma formulação e outra, com o objetivo de limpar o palato. As amostras de patê contendo 20g foram servidas devidamente codificadas com uma seqüência de três dígitos.

As amostras foram servidas de forma simultânea aos provadores, em um prato branco com quatro divisões, sendo uma para cada amostra.

3.5.1 Teste de comparação múltipla para verificação de “off flavour”

Uma vez que os valores analíticos de TBARS por si só não são capazes de mensurar a influência da taxa de oxidação lipídica sobre o sabor dos alimentos, torna-se necessária a aplicação de testes sensoriais concomitantemente à realização destas análises.

Este teste foi realizado para comparar as formulações de patê F3 em diferentes períodos de armazenamento (1, 60, 90 e 120 dias).

A formulação F3 foi eleita para realização deste teste em razão de ter apresentado maior vida útil que a formulação FC, SC e F1, ter apresentado ação bactericida frente à inoculação de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397) em temperatura abusiva de 30°C, além de possuir menor custo e menor teor de sódio quando comparada à F5. A ficha referente ao teste foi distribuída (ANEXO C), explicando-se aos provadores que o objetivo do mesmo seria verificar a preferência de sabor entre as amostras oferecidas em relação à primeira amostra (1 dia de armazenamento), codificada como P (padrão), de modo a classificá-las como “mais preferida”, “igual preferência” ou “menos preferida” que a amostra P. Foi solicitado aos provadores que fizessem o teste com calma, só classificando as amostras quando tivessem certeza e que consumissem água e biscoito entre uma amostra e outra. As

respostas dos provadores em escala nominal foram transformadas em valores numéricos, sendo:

Mais preferida que P: extrema : 9; grande: 8; moderada: 7; pequena: 6

Preferida igual a P: nenhuma: 5

Menos preferida que P: pequena: 4; moderada: 3; grande: 2; extrema: 1

3.5.2 Teste de aceitação em escala hedônica de 9 pontos

Este teste objetivou avaliar a aceitação das amostras teste (SC e F3) e amostras comerciais (CV e CB), em relação aos atributos de aceitação global, cor, aroma, consistência e sabor, obrigatoriamente nesta ordem. A amostra teste SC foi escolhida a fim de verificar se a substituição dos sais de cura por nisina poderia influenciar principalmente os atributos de cor e sabor do produto quando comparada à amostra F3 que continha 300 mg/kg de nisina, enquanto a amostra comercial em bisnaga foi escolhida para verificar se este tipo de embalagem pode influenciar no sabor e/ou na cor do mesmo quando comparada à embalagem em vidro.

Foi entregue aos provadores a ficha específica do teste (ANEXO D) e explicado que deveriam inferir notas de 1 (desgostei muitíssimo) a 9 (gostei muitíssimo) para cada atributo individualmente em cada amostra (MEIGAARD et al., 1999).

3.5.3 Teste de intenção de compra

O teste de intenção de compra foi utilizado para verificar a real intenção em adquirir cada produto caso este fosse comercializado, utilizando-se uma escala de 1 a 5, variando desde certamente compraria (1) a certamente não compraria (5). A ficha específica para o teste foi entregue aos provadores (ANEXO E) e em seguida o prato com as amostras teste SC e F3 e comerciais CV e CB.

3.5.3.1 Análise estatística

As respostas geradas pelos testes sensoriais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando os tratamentos (amostras) específicas para cada teste. As médias obtidas no teste de comparação múltipla (“*off flavour*”) foram submetidas ao teste de Dunnett à 5% de significância, enquanto as médias obtidas pelo teste de aceitação em escala hedônica de 9 pontos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott à 5% de significância, utilizando-se o sistema estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados das Análises Físicas e Químicas

4.1.1 Composição química

Existem diversos trabalhos determinando a composição química de patês à base de peixes diversos, como: tilápia, flaminguinha, atum e salmão, patês de fígado e patês de presunto (SOUZA et al., 2003; MINOZZO, 2004; CROSS, 2004; D'ARRIGO et al., 2004; ESTÉVEZ, VENTANAS, CAVA, 2005; SCHOSLER, 2009; MINOZZO, 2010; RESENSE, 2010), porém poucos se referem ao patê de frango, dificultando a comparação de resultados encontrados nesta pesquisa. Por esta razão, foram avaliadas também amostras comerciais de patê de frango, embaladas em vidro (CV), bisnaga (CB) e lata (CL).

Os valores médios de composição química das amostras teste e comerciais são vistos na Tabela 8.

Tabela 8. Médias* seguidas pelos erros padrão dos teores de umidade, cinzas, proteína, lipídios e carboidratos totais das amostras teste e comerciais

Amostras**	Composição Química				
	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Lipídios (%)	Carboidratos(%) ⁺
FC	64,37 ^b ± 0,68	2,74 ^d ± 0,13	15,94 ^a ± 0,25	14,68 ^b ± 0,24	2,270 ^e ± 0,05
SC	64,46 ^b ± 0,68	3,19 ^c ± 0,13	15,27 ^a ± 0,25	14,19 ^b ± 0,24	2,890 ^d ± 0,05
F1	65,31 ^b ± 0,68	3,46 ^c ± 0,13	15,17 ^a ± 0,25	13,43 ^c ± 0,24	2,630 ^d ± 0,05
F3	64,76 ^b ± 0,68	3,84 ^b ± 0,13	15,39 ^a ± 0,25	14,26 ^b ± 0,24	1,750 ^f ± 0,05
F5	63,91 ^b ± 0,68	4,36 ^a ± 0,13	14,56 ^a ± 0,25	14,43 ^b ± 0,24	2,740 ^d ± 0,05
CV	67,77 ^a ± 0,68	2,45 ^d ± 0,13	11,85 ^b ± 0,25	14,06 ^b ± 0,24	3,870 ^c ± 0,05
CB	62,92 ^b ± 0,68	1,63 ^e ± 0,13	12,34 ^b ± 0,25	16,10 ^a ± 0,24	7,010 ^a ± 0,05
CL	68,42 ^a ± 0,68	3,18 ^c ± 0,13	9,840 ^c ± 0,25	13,92 ^c ± 0,24	4,640 ^b ± 0,05
CV (%)***	1,82	7,02	3,08	2,95	2,37

*Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.
+ carboidratos totais obtidos por diferença.

** FC – Formulação controle, sem conservadores, SC – Formulação com 150 mg/kg de sal de cura, F1 – Formulação com 100mg/kg de nisina, F3 – Formulação com 300mg/kg de nisina, F5 – Formulação com 500mg/kg de nisina, CV – Amostra comercial em vidro, CB – Amostra comercial em bisnaga, CL – Amostra comercial em lata.

*** CV (%) – Coeficiente de variação em porcentagem.

As médias dos resultados obtidos para o valor calórico são vistos na Tabela 9.

Tabela 9. Médias* seguidas pelos erros padrão do valor calórico das amostras teste e comerciais

Amostras**	Valor calórico (Kcal/100g)
FC	205,0 ^b ± 2,22
SC	200,4 ^b ± 2,22
F1	192,1 ^c ± 2,22
F3	196,9 ^c ± 2,22
F5	199,1 ^c ± 2,22
CV	189,4 ^d ± 2,22
CB	222,3 ^a ± 2,22
CL	183,2 ^d ± 2,22
CV (%)***	2,01

*Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

** FC – Formulação controle, sem conservadores, SC – Formulação com 150 mg/kg de sal de cura, F1 – Formulação com 100mg/kg de nisina, F3 – Formulação com 300 mg/kg de nisina, F5 – Formulação com 500mg/kg de nisina, CV – Amostra comercial em vidro, CB – Amostra comercial em bisnaga, CL – Amostra comercial em lata.

***CV – Coeficiente de variação em porcentagem.

Observou-se que os teores de umidade, lipídios, carboidratos e proteína, tanto das formulações teste como das amostras comerciais encontravam-se dentro dos padrões estabelecidos pelo regulamento técnico de identidade e qualidade de patê, que fixa em um máximo de 70%, 32% e 10% os teores umidade, lipídios e carboidratos respectivamente e em um mínimo de 8% o teor de proteínas (BRASIL, 2000).

De forma geral, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras teste e comerciais somente para CV e CL que apresentaram maior teor de umidade (67,77 e 68,42%, respectivamente) quando comparadas às demais amostras (62,92 a 65,31%). Minozzo (2004) comparou patês comerciais de atum e presunto com patê de tilápia do Nilo elaborado pelo autor e encontrou teores mais baixos de umidade no patê de tilápia (59,47%) e presunto (52,13%) e mais altos em patê de atum (76,30%), quando comparados à presente pesquisa, estando o patê de atum acima do máximo permitido pela legislação. Foram relatados valores de umidade de 58,77, 61,08 e 62,02%, respectivamente em patês de tilápia, armado e flaminguinha elaborados por Minozzo (2010). Cros (2004) encontrou valor de umidade de 57,5% em patê de salmão. Diferentemente destes autores que adicionaram gordura vegetal hidrogenada nas formulações de patê, Resende (2010), encontrou valores bastante semelhantes aos da presente pesquisa em patê de tilápia contendo óleo de canola (63,08%). Outros autores trabalhando com patês de presunto relataram valores de umidade mais baixos que os encontrados nesta pesquisa (entre 63,91 e 65,31%). Ao adicionar globinas bovina e carboximetilcelulose como agentes emulsionantes em patê de presunto, Silva et al. (2003) encontraram valores de umidade entre 59,29 e 61,53%. Schossler (2009) encontrou valores ainda menores de umidade para patê de presunto adicionado de cultura probiótica, relatando

valores entre 50,1 e 50,2%. Ao trabalharem com patês de fígado, alguns autores também relataram valores mais baixos de umidade. Ao utilizar fígados e gordura de suínos alimentados com cinco diferentes dietas enriquecidas com ácidos graxos poliinsaturados (óleo de girassol, óleo de linhaça, azeite de oliva, mistura de óleo de linhaça e azeite de oliva e α -tocoferol), adicionados de 200mg de α -tocoferol às formulações, D'Arrigo et al. (2004) encontraram valores de umidade entre 51,18% (dieta contendo 30g/kg de óleo de linhaça + α -tocoferol) e 53,74% (dieta contendo 15g/kg de óleo de linhaça + 15g/kg de azeite de oliva sem adição de α -tocoferol). Estévez, Ventanas e Cava (2005), avaliando o efeito da adição de de diferentes concentrações de gordura saturada (gordura animal) em patês de fígado, relataram valores de umidade entre 52,78% para formulações contendo 45% de gordura animal e 59,68% para formulações de patê contendo 35% de gordura animal.

Para os teores de proteína não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações teste (com valores médios de 15,40%), porém comparando estas com as formulações comerciais, observou-se redução significativa no teor de proteína destas últimas (sendo que o valor mínimo encontrado foi de 9,84% para a amostra CL). Os valores encontrados tanto nas formulações teste como nas amostras comerciais foram superiores aos encontrados por Minozzo et al. (2004) e Minozzo (2010) sendo de 14,56 a 15,94% para as amostras teste e entre 9,84 e 12,34% para as amostras comerciais. Este resultado era esperado, uma vez que nas formulações teste foram utilizados filezinhos de frango que possuem alto teor protéico, enquanto as formulações comerciais utilizam geralmente resíduos cárneos. Além disso, as formulações teste também utilizaram iogurte natural, outra fonte protéica. Apesar do Nisaplin™ conter cerca de 12% de proteína em sua composição, sua adição mesmo em maiores concentrações como no caso de F5 não alterou significativamente o valor proteico do produto final, justamente em razão da adição de carne de frango e iogurte em maior proporção. Minozzo et al. (2004) encontraram valores de proteína para patê de tilápia de 8,53%, de 6,83% para patê comercial de atum e 9,05% para patê comercial de presunto, sendo que o patê comercial de atum encontrava-se abaixo do limite mínimo de 8% preconizado pela legislação. Cros (2004) encontrou valor de proteína de 8,1% para patê de salmão. Silva et al. (2003) relatou valores entre 12,31 e 13,38% para patês de presunto adicionados de globinas bovina e carboximetilcelulose. Minozzo (2010) encontrou valores de proteína para patê de tilápia, armado e flaminguinha, respectivamente de 10,96, 9,63 e 11,97%. Por outro lado, Schosler (2009) encontrou valores maiores a todos os trabalhos supracitados para proteína, inclusive maiores que os da presente pesquisa com patê de frango, relatando valores de 18 a 18,2% em patê de presunto inoculado com cultura probiótica. Isto pode ser explicado pelo uso de matéria-prima em maior quantidade, além da adição de micro-organismos probióticos, proporcionando um incremento no valor protéico do produto final. Com relação ao teor de proteínas de patês de fígado, D'Arrigo et al. (2004) relatou valores mais baixos, entre 9,25% (dieta contendo 30g/kg de óleo de linhaça + α -tocoferol) e 10,26% (dieta contendo 30g/kg de óleo de linhaça sem adição de α -tocoferol à formulação). Já Estévez, Ventanas e Cava (2005) encontraram valores de proteína entre 12,1% e 14,1% para formulações contendo 45% e 35% de gordura animal, respectivamente.

Com relação às frações de cinzas, lipídios e carboidratos, detectou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as formulações teste entre si e as amostras comerciais, com diferença significativa ($p \leq 0,05$) para o teor de cinzas entre as amostras teste e as amostras comerciais, sendo que F5 apresentou o maior valor (4,36%), seguida de F3 (3,84%) e F1 (3,46%), enquanto menores valores foram encontrados em SC (3,19%) e FC (2,74%) e nas comerciais CV (2,45%) e CB (1,63%). Estes resultados podem ser explicados pelo fato do Nisaplin™ (nisina comercial) ser constituído de cerca de 74,70% de cloreto de sódio, de modo que quanto maior a concentração utilizada no produto (no caso F5), maior seria o valor de cinzas no produto final. As formulações FC, SC, CV e CB não continham Nisaplin™.

Valores semelhantes foram relatados por outros autores. Minozzo et al. (2004) encontraram valores de cinzas de 2,20% para patê de tilápia elaborado pelos autores, 2,96% para patê comercial de atum e 2,53% para patê comercial de presunto. Cros (2004) encontrou valor de cinzas de 2,40% em patê de salmão. Minozzo (2010) encontrou valores de cinzas de 2,35, 2,51 e 2,64% respectivamente para patês de tilápia, armado e flaminguinha. Ao avaliar o efeito da adição de cultura probiótica em patê de presunto, Schossler (2009) encontrou maiores valores para cinzas (entre 3,6 e 3,7%). Contudo, a autora relatou a adição de maior concentração de cloreto de sódio às formulações, quando comparada às demais formulações de frango da presente pesquisa e de pescado de outros trabalhos. Por outro lado, Silva et al. (2003) encontraram valores mais baixos para cinzas em patês de presunto adicionados de globinas bovina e carboximetilcelulose, encontrando valores entre 1,76 a 1,86%. Estes autores adicionaram menores concentrações de sal ao produto, e por isto obtiveram menores teores de cinzas no produto final. Em patês utilizando fígado e gordura de suínos, D'Arrigo et al. (2004) encontraram valores de cinzas entre 2,24% (contendo 30g/kg de óleo de linhaça, sem adição de α -tocoferol à formulação) e 2,59% (contendo 30g/kg de óleo de linhaça + α -tocoferol à formulação). Estévez, Ventanas e Cava (2005) relataram valores de 3,27% e 3,59% para patês de fígado contendo 45% e 35% de gordura animal, respectivamente.

Quanto ao teor de lipídios, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras teste e as amostras comerciais, sendo que a comercial CB apresentou maior valor (16,10%), enquanto os menores valores foram encontrados em F1 (13,43%) e CL (13,92%). Estes resultados mostram que o teor de lipídios não foi influenciado pelo tipo e nem pela concentração adicionada de conservadores. A principal diferença entre as formulações teste e comerciais foi na qualidade das fontes lipídicas adicionadas. As amostras teste foram elaboradas com azeite de oliva extra virgem, rico em ácido oléico, um ácido graxo de cadeia monoinsaturada, benéfico à saúde, enquanto as amostras comerciais continham gordura animal, rica em ácidos graxos de cadeia saturada, sendo sua ingestão relacionada à maior incidência de doenças cardiovasculares. O patê de frango foi elaborado com corte praticamente isento de gordura (filés de peito), sendo que a única fonte de lipídeo adicionada foi o azeite em menor proporção (cerca de 14%) e o iogurte elaborado com leite integral (cerca de 3% de lipídios) quando comparada à quantidade adicionada pelos demais autores (acima de 20%). Além do benefício nutricional advindo da substituição da gordura animal por azeite de oliva, os ácidos graxos de cadeia saturada (gordura animal) dificultam a solubilidade da nisina, enquanto a adição de fontes de ácidos graxos insaturados (azeite) ao contrário, favorecem sua dissolução no meio. O teor de lipídios encontrados nas formulações teste foram abaixo dos encontrados em alguns trabalhos com patês. Aquerreta et al. (2002), encontraram em patês de atum, salmão e anchova, 10,01%, 28,90% e 26,16% de lipídios respectivamente. Echarte et al. (2004), encontraram em patês de salmão anchova e bacalhau, 26,39%, 16,10% e 13,72% de lipídios respectivamente. Silva et al. (2003) relataram valores mais elevados de lipídios para patês de presunto adicionado de globinas bovina e carboximetilcelulose, sendo de 24,40 a 25,35%. Valores elevados de lipídios também foram relatados por Schossler (2009) em patês de presunto inoculados com cultura probiótica (entre 26 e 26,3%). D'Arrigo et al. (2004) relataram maiores concentrações de lipídios em patês de fígado e gordura de suínos, entre 38,70% para patês formulados com fígado e gordura animal obtidos de uma dieta contendo 30g/kg de óleo de linhaça + α -tocoferol) e 40,37% obtidos da dieta contendo 15g/kg de óleo de linhaça + 15g/kg de azeite de oliva, sem α -tocoferol na formulação). Estévez, Ventanas e Cava (2005) encontraram valores de lipídios para patês de fígado entre 31,19% (contendo 45% de gordura animal) e 20,49% em patês de fígado contendo 35% de gordura animal. Minozzo et al. (2004) relataram valores de lipídios de 27,41% para patê de tilápia elaborado pelos autores, 3,49% para patê comercial de atum e 17,72% para patê comercial de presunto. Cros (2004) encontrou valor médio de 28,2% para

patê de salmão. Minozzo (2010) encontrou valores de 27,54, 23,53 e 22,37% respectivamente para patê de tilápia, patê de armado e patê de flaminguinha. Estes trabalhos mostram a influência da escolha da matéria-prima para a produção de patês. Além da maior adição de lipídios relatada pelos autores, algumas espécies de peixes (classificados como peixes gordos), possuem naturalmente maiores quantidades de lipídios no músculo, principalmente peixes oriundos de águas mais frias. A gordura funciona como um isolante térmico e fornecedora de energia para estes tipos de peixes suportarem temperaturas mais frias. Outros peixes, ao contrário, possuem menos gordura no músculo (peixes magros). O mesmo ocorre com as diferentes raças de suínos, promovendo um aumento ou redução da concentração de lipídios totais na carne, dependendo da alimentação e fatores genéticos permitindo um depósito maior ou menor de gordura na carne. Davies et al. (1999) avaliaram a influência do teor de lipídios no meio e a atividade da nisina e constataram que quanto maior a concentração de lipídios menor a atividade da nisina. Delves-Broughton et al. (2005) verificaram que a nisina não se mostrou efetiva mesmo em concentrações consideradas inviáveis economicamente quando utilizada em bacon, confirmando os resultados encontrados por Davies et al. (1999).

Para carboidratos totais, os valores médios mostraram que as amostras comerciais apresentaram maior valor quando comparadas às formulações teste, destacando a amostra CB (7,01%), seguida de CL (4,64%) e CV (3,84%). As maiores concentrações de carboidratos totais encontradas em marcas comerciais quando comparadas às amostras teste, indicaram que as comerciais poderiam conter amido. Foi realizado então o teste rápido para detecção de amido, adicionando-se 1 gota de solução de iodo à 2% em cerca de 10g de amostra em vidro de relógio, verificando-se que houve formação de coloração azulada, o que confirma a suspeita de adição de amido. Carnes de forma geral não apresentam quantidade significativa de carboidratos, uma vez que a maior expressão destes está sob forma de glicogênio armazenado no fígado e disponível nos músculos. Porém, o glicogênio muscular é convertido em ácido láctico após a morte dos animais, e por isto, praticamente não há mais nenhuma forma de carboidrato presente na carne. O teor de carboidratos encontrado nos patês foram oriundos da adição de ingredientes como a sacarose (açúcar comum) ou amido (polissacarídeo) no caso das amostras comerciais, além de condimentos e aditivos que contenham carboidratos, como o Nisaplin™ que contém cerca de 12% de carboidratos. Minozzo et al. (2004) encontraram valores de carboidratos de 2,39% para patê de tilápia elaborado pelos autores, 10,22% para patê comercial de atum e 18,57% para patê comercial de presunto, sendo que os patês comerciais de atum e presunto neste caso não atenderam a legislação. Minozzo (2010) encontrou valores de 0,38, 3,25 e 1,00% de carboidratos respectivamente em patês de tilápia, armado e flaminguinha, valores estes muito abaixo dos encontrados na presente pesquisa para as amostras teste (entre 1,75 e 2,89%). Porém Estévez, Ventanas e Cava (2005) relataram valores semelhantes à presente pesquisa em patê de fígado e gordura de suínos, entre 1,10% (patês contendo 45% de gordura animal) e 2,10% (patês com 35% de gordura animal).

Com relação ao valor calórico, pôde-se observar que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras teste e comerciais, sendo que a amostra comercial CB apresentou maior valor calórico (222,3 Kcal/100g) do que as demais comerciais CV (189,4Kcal/100g) e CL (183,2 Kcal/100g) e as formulações teste (com valores médios de 198,7 Kcal/100g). Isto ocorreu pelo fato da amostra CB ter apresentado maior teor de lipídios e carboidratos totais. O tipo de conservador adicionado não influenciou no valor calórico dos produtos finais, uma vez que não houve diferença entre SC, F3 e F5. Porém, observa-se que F1 apresentou menor valor calórico quando comparado à F3 e F5. O conservador Nisaplin™ contém carboidratos totais em sua composição, de modo que quanto maior sua adição, maior o incremento no teor de carboidratos totais, o que aumenta o valor calórico do produto final. Minozzo et al. (2004)

relataram valores calóricos de 246 Kcal/100g para patê de tilápia elaborado pelos autores, 33Kcal/100g para patê comercial de atum e 159 Kcal/100g para patê comercial de presunto.

Os valores encontrados para opatê de tilápia e de presunto são mais elevados do que os encontrados nas formulações teste (134,2 - 138,7 Kcal/100g) e semelhantes às amostras comerciais (183,2 - 222,3 Kcal/100g).

Contudo, Minozzo (2010) encontrou maiores valores calóricos em patês de armado e flaminguinha (respectivamente 264 e 254 Kcal/100g). Maiores valores também foram encontrados por Estévez, Ventanas e Cava (2005) em patês de fígado, sendo de 249Kcal/100g para patês contendo 45% de gordura animal e 334Kcal/100g para patês contendo 35% de gordura animal quando comparados às amostras teste e comerciais.

4.1.2 Teor de cloretos e minerais (Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺)

Os resultados das médias do teor de cloretos e minerais (Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺) são vistos na Tabela 10.

Tabela 10. Médias* seguidas pelos erros padrão dos teores de cloretos e minerais Na⁺, K⁺ e Ca⁺⁺ das amostras teste e comerciais

Amostras**	Composição em cloretos e minerais			
	Cloretos (%)	Na ⁺ (mg/100g)	K ⁺ (mg/100g)	Ca ⁺⁺ (mg/100g)
FC	1,089 ^e ± 0,05	476,4 ^e ± 31,29	410,4 ^a ± 17,88	188,5 ^a ± 6,02
SC	1,200 ^e ± 0,05	492,9 ^e ± 31,29	378,9 ^a ± 17,88	95,46 ^b ± 6,02
F1	1,489 ^d ± 0,05	562,3 ^d ± 31,29	426,3 ^a ± 17,88	103,3 ^b ± 6,02
F3	2,318 ^b ± 0,05	761,0 ^b ± 31,29	430,9 ^a ± 17,88	102,1 ^b ± 6,02
F5	2,772 ^a ± 0,05	818,0 ^a ± 31,29	433,7 ^a ± 17,88	110,5 ^b ± 6,02
CV	1,628 ^d ± 0,05	669,5 ^c ± 31,29	153,2 ^b ± 17,88	42,11 ^d ± 6,02
CB	1,272 ^e ± 0,05	441,2 ^e ± 31,29	91,71 ^b ± 17,88	63,95 ^c ± 6,02
CL	2,097 ^c ± 0,05	677,7 ^c ± 31,29	130,6 ^b ± 17,88	100,4 ^b ± 6,02
CV (%)***	4,86	8,50	10,09	10,34

*Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

**FC - sem conservadores; SC - com 150 mg/kg de sal de cura; F1 - com 100 mg/kg de nisina; F3 - com 300 mg/kg de nisina; F5 - com 500 mg/kg de nisina; CV - amostra comercial em vidro; CB - amostra comercial em bisnaga; CL - amostra comercial em lata.

***CV(%) – Coeficiente de variação em porcentagem.

Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras teste e comerciais para os valores de cloretos, sódio, potássio e cálcio.

Os resultados mostraram que a amostra F5 apresentou o maior teor de cloretos e íons sódio, quando comparada às demais formulações teste e comerciais.

Isto pode ser explicado pelo fato da nisina comercial conter 74,70% de cloreto de sódio em sua composição. Assim, era esperado que quanto maior a concentração de nisina utilizada, maior o teor de cloretos e íon sódio encontrado no produto final, o mesmo se refletindo no teor de sódio.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as formulações teste para o teor de potássio (K^+). Todas as formulações foram adicionadas de sal light (constituído de 50% de sódio e 50% de potássio) na mesma concentração (15g) e portanto, estes resultados eram esperados. Porém houve diferença entre as amostras teste e comerciais ($p \leq 0,05$), sendo que estas últimas apresentaram menor valor para o teor de potássio. As amostras comerciais não utilizaram o sal light, uma vez que os teores de sódio mantiveram-se mais elevados. Portanto, era esperado que apresentassem menores valores para o teor de potássio. Minozzo (2010) encontrou maiores valores para patês de tilápia, armado e flaminguinha (respectivamente 170, 82, 161,54 e 165,47mg/100g). Estes valores são maiores do que os encontrados nas formulações teste e comerciais de patê de frango. Peixes constituem-se em importantes fontes de minerais como potássio e fósforo, sendo esperado portanto que seus produtos derivados apresentem maiores teores de potássio.

O teor de cálcio (Ca^{++}) encontrado em todas as formulações teste deveu-se à adição de iogurte natural às mesmas, onde o leite adicionado apresentava 105mg de cálcio/100mL (informações do rótulo do produto). O valor mais elevado de cálcio (semelhante às amostras teste) encontrada na formulação CL deveu-se provavelmente à adição de carne mecanicamente separada (CMS), uma vez que há presença deste mineral nos ossos das aves. Minozzo (2010) encontrou valores de cálcio de 21,42, 27,94 e 107,73 mg/100g, respectivamente para patês de tilápia, armado e flaminguinha, sendo encontrado valores semelhantes à presente pesquisa com patê de frango para o patê de flaminguinha.

4.1.3 pH

As médias e os erros padrão das amostras teste são vistos na Tabela 11.

Tabela 11. Médias*seguidas pelos erros padrão dos valores de pH das amostras teste

Amostras**	pH				
	Dias de armazenamento				
	1	60	120	180	Médias
FC	5,73 ^{Ab} ±0,04	5,70 ^{Ab} ±0,04	5,75 ^{Ab} ±0,04	5,84 ^{Aa} ±0,04	5,76 ^a ±0,03
SC	5,41 ^{Bb} ±0,04	5,39 ^{Cb} ±0,04	5,42 ^{Cb} ±0,04	5,77 ^{Aa} ±0,04	5,50 ^c ±0,03
F1	5,50 ^{Bb} ±0,04	5,57 ^{Bb} ±0,04	5,60 ^{Bb} ±0,04	5,80 ^{Aa} ±0,04	5,62 ^b ±0,03
F3	5,37 ^{Bc} ±0,04	5,62 ^{Bb} ±0,04	5,63 ^{Bb} ±0,04	5,81 ^{Aa} ±0,04	5,61 ^b ±0,03
F5	5,44 ^{Bc} ±0,04	5,74 ^{Ab} ±0,04	5,78 ^{Ab} ±0,04	5,77 ^{Ab} ±0,04	5,68 ^a ±0,03
Médias	5,49 ^C ±0,01	5,60 ^B ±0,01	5,64 ^B ±0,01	5,80 ^A ±0,01	

*Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.

** FC – sem conservadores, SC – Formulação com adição de 150mg/kg de sal de cura, F1 – Formulação com adição de 100 mg/kg de nisina, F3 – Formulação com adição de 300 mg/kg de nisina, F5 – Formulação com adição de 500 mg/kg de nisina.

Os resultados de pH mostraram que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos e ao longo do período de armazenamento, ocorrendo uma elevação significativa em todas as formulações ao final de 180 dias, exceto para F5 que teve o pH estabilizado a partir dos 60 dias. Observou-se uma elevação significativa ($p \leq 0,05$) do pH dos patês ao longo

do armazenamento. Entretanto, aos 180 dias de armazenamento a formulação F5 foi a que apresentou a menor alteração do pH. A atividade proteolítica de micro-organismos como os do gênero *Clostridium* pode ter ocasionado aumento no pH do produto. Num estágio avançado de degradação podem ocorrer ainda reações de descarboxilação e desaminação de aminoácidos que liberam amônia ao meio (JAY, 2005), o que não chegou a ser observado em nenhum destes tratamentos.

De acordo com Herman et al. (2009), o pH, aliado ao processamento térmico, constitui um parâmetro fundamental para manutenção da qualidade microbiológica do produto final. Entretanto, é recomendado que o pH dos produtos não se altere de forma significativa ao longo do período de vida útil, uma vez que isto pode prejudicar os atributos sensoriais e interferir na funcionalidade dos aditivos utilizados em sua conservação.

Observou-se que as formulações de patê, apesar de armazenadas por um longo período, apresentaram valores médios entre 5,37 e 5,84. A formulação controle (sem conservadores) foi a que apresentou maior valor de pH inicial, embora os valores finais não tenham sido significativos. A adição de ingredientes mais ácidos à formulação, como o iogurte (pH 4,24), o vinho tinto (pH 3,07) e suco de limão (pH 2,08) contribuiu para maior redução de pH no produto final,

De acordo com Delves-Broughton (2005), estes valores encontram-se na faixa ótima de atuação da nisina (entre 2,0 e 6,0). Assim, a obtenção de pH abaixo de 6,0 é desejável do ponto de vista de segurança do produto uma vez que pH próximos à neutralidade favorecem o desenvolvimento da maioria dos micro-organismos. Porém a redução excessiva pode vir a comprometer a estabilidade da emulsão e os atributos sensoriais do produto final.

Outros autores que utilizaram sais de cura, relataram valores de pH mais elevados que os encontrados nesta pesquisa. Silva et al. (2003), ao avaliar o efeito da adição de globinas bovina extraída pelo método da acetona acidificada (PGT), comparada à adição de caseinato de sódio (PCA) e caboximetilcelulose (PGCMC) como agentes emulsionantes em patê de presunto, encontraram valores iniciais de pH 5,14 (PGT), 6,57 (PCA) e 6,52 (PGCMC) e finais 4,82 (PGT), 6,35 (PCA) e 6,36 (PGCMC) aos 45 dias mantidos sob refrigeração. Observou-se que neste caso, o resultado obtido para o pH inicial com a adição de PGT foi semelhante o encontrado na presente pesquisa, porém o pH final ficou muito abaixo do encontrado. Os demais tratamentos (PCA e PGCMC) apresentaram valores iniciais e finais de pH bem mais elevados do que os encontrados em todos os tratamentos na presente pesquisa. Valores de pH elevados também foram relatados por Schossler (2009) verificando valores de pH iniciais de 6,10 e finais de 6,50 em patês de presunto inoculados com cepa probiótica de *Bifidobacterium lactis* armazenados por 31 dias sob refrigeração. Resende (2010) relatou valores em torno de 6,15 para patês de tilápia adicionados de óleo de canola, enquanto Minozzo (2010) encontrou valores iniciais mais elevados para pH em patês formulados com tilápia (6,65-6,68), com armado (6,80-6,86) e com flaminguinha (7,03-7,08).

Apesar das divergências encontradas nos valores de pH da presente pesquisa em relação aos encontrados em outros trabalhos, a maioria se encontra de acordo com os parâmetros estabelecidos pelas Normas Sanitárias do Instituto Adolfo Lutz (1967), que consideram que o pH do patê deve ser levemente ácido, exceto as formulações que utilizaram flaminguinha.

O pH, a atividade de água e a umidade são parâmetros bastante importantes a serem verificados, uma vez que exercem influência sobre as características físicas e químicas do produto final e na multiplicação dos micro-organismos, de forma a determinar a qualidade e a estabilidade destes (TERRA; FREITAS; CICHOSK, 2007).

4.1.4 Atividade de água (Aa)

A atividade de água (Aa) é entendida como a quantidade de água livre disponível no alimento. Significa a relação entre a pressão de vapor de equilíbrio do substrato e a pressão de vapor da água pura à mesma temperatura (JAY, 2005).

As médias dos resultados da análise de atividade de água, são vistas na Tabela 12.

Tabela 12. Médias* seguidas pelos erros padrão de Atividade de água (Aa) das amostras teste e comerciais

Amostras**	Aa	T°C da amostra
FC	0,989 ^a ± 0,003	28,6 ^a ± 0,23
SC	0,985 ^a ± 0,003	29,3 ^a ± 0,23
F1	0,986 ^a ± 0,003	28,8 ^a ± 0,23
F3	0,977 ^b ± 0,003	29,2 ^a ± 0,23
F5	0,971 ^b ± 0,003	29,4 ^a ± 0,23
CV	0,990 ^a ± 0,003	29,0 ^a ± 0,23
CB	0,981 ^b ± 0,003	29,3 ^a ± 0,23
CL	0,991 ^a ± 0,003	28,9 ^a ± 0,23
CV(%)***	0,44	1,4

*Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

**FC – sem conservadores, SC – Formulação com 150mg/kg de sal de cura, F1 – Formulação com 100 mg/kg de nisina, F3 – Formulação com 300 mg/kg de nisina, F5 – Formulação com 500 mg/kg de nisina, CV – Amostra comercial em vidro, CB – Amostra comercial em bisnaga, CL – Amostra comercial em lata.

***CV(%) – Coeficiente de variação em porcentagem

Houve diferença significativa na comparação entre os diferentes tratamentos e também entre as amostras comerciais ($p \leq 0,05$).

Comparando-se somente as amostras teste contendo conservadores (SC, F1, F3 e F5), observa-se as formulações SC e F1 apresentaram maior atividade de água do que F3 e F5.

Isto indica que estas últimas apresentavam maior quantidade de solutos (cinzas) do que as demais amostras.

Observou-se que houve influência da concentração de Nisaplin™ adicionada, mostrando que a Aa de F1 (0,986) foi maior que a de F3 (0,977) e F5 (0,971). Isto é explicado pelo fato do Nisaplin™ ser constituído de cerca de 74% de cloreto de sódio, de modo que quanto maior sua adição, menor a Aa no produto final.

Quanto maior a atividade de água, maior a susceptibilidade à contaminação microbiana e à oxidação lipídica, uma vez que o oxigênio presente na água favorece as reações de oxidação.

Os resultados, tanto para as amostras teste como para as amostras comerciais mostram que os patês apresentaram atividade de água bastante elevada, entre 0,971 (F5) e 0,991 (CL). Estes resultados eram esperados, em razão do patê ser um produto bastante cominuído, com maiores teores de umidade e de lipídios, que lhes conferem a textura característica.

De forma geral, as bactérias são mais exigentes com relação à maior atividade de água necessária para seu crescimento, sendo que as Gram – negativas são mais exigentes do que as

Gram-positivas. As bactérias deteriorantes não crescem em atividade e água menores que 0,91. As bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* conseguem crescer em atividade de água de até 0,86, enquanto *Clostridium botulinum* não cresce em atividade de água menor que 0,94 (JAY, 2005).

Minozzo (2010) ao adicionar gordura vegetal hidrogenada, encontrou valores inferiores à estes resultados, ao determinar a atividade de água para patês de tilápia, armado e flaminguinha, relatando valores de 0,941, 0,941 e 0,942 respectivamente.

Os valores de pH iniciais e finais mais baixos encontrados nesta pesquisa quando comparados aos dos demais autores, aliado à uma redução da atividade de água e de umidade, principalmente nas formulações teste F3 e F5, contribuiu para um aumento na vida útil das mesmas quando comparadas às formulações teste FC, SC e F1.

4.1.5 Perfil em ácidos graxos

Tabela 13. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra FC nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento

Amostras **						
FC						
Ácidos Graxos Totais	1 dia (g/100g)	%	90 dias (g/100g)	%	180 dias (g/100g)	%
C14	0,094	0,640	0	0	0,096	0,654
C16	1,740	11,85	1,817	12,38	1,710	11,65
C16:1	0,124	0,845	0,131	0,892	0,130	0,886
C18	0,612	4,169	0,568	3,869	0,539	3,672
C18:1t	0	0	0	0	0	0
C18:1	9,879	67,30	9,640	65,67	10,26	69,89
C18:2	1,156	7,875	1,284	8,747	0,957	6,519
C18:3t	0	0	0	0	0	0
C18:3w3	0,124	0,845	0,158	1,076	0,111	0,756
C20	0,051	0,347	0	0	0	0
C20:3	0,227	1,546	0,250	1,703	0,250	1,703
C22	0	0	0	0	0	0
C23	0,043	0,293	0	0	0	0
NI*	0,630	4,292	0,831	5,661	0,630	4,292
ΣAGS	2,540	17,30	2,385	16,25	2,345	15,97
ΣAGMI (C16:1 + C18:1)	10,00	68,12	9,771	66,56	10,39	70,78
ΣAGPI (C18:2 + C20:3)	1,383	9,421	1,534	10,45	1,207	8,222
ΣAGT (C18:1t + C18:3t)	0	0	0	0	0	0
ΣAGw3	0,124	0,845	0,158	1,076	0,111	0,756
ΣNI*	0,630	4,292	0,831	5,661	0,630	4,292
Ácidos Graxos Totais	14,68	100	14,68	100	14,68	100

** FC – Formulação controle (sem conservadores)

C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C16:1 – ácido palmitoléico, C18 – ácido esteárico, C18:1t – ácido elaídico, C18:1 – ácido oléico, C18:2 – ácido linoléico (ω -6), C18:3 ω 3 – ácido α -linolênico, C20- ácido araquídico, C20:3 – ácido eicosatrienóico, C22 – ácido behênico, C23 – ácido tricosanóico.

NI* - não identificado, ΣAGS – somatório de ácidos graxos saturados, ΣAGMI – somatório de ácidos graxos monoinsaturados, ΣAGPI – somatório de ácidos graxos poliinsaturados, ΣAGT – somatório de ácidos graxos trans, ΣAG ω 3 – somatório de ácidos graxos ômega 3, ΣNI* - somatório de ácidos graxos não identificados.

Tabela 14. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra SC nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento

Amostras **						
SC						
Ácidos Graxos Totais	1 dia (g/100g)	%	90 dias (g/100g)	%	180 dias (g/100g)	%
C14	0,080	0,564	0,065	0,458	0,083	0,585
C16	1,681	11,85	1,618	11,40	1,568	11,05
C16:1	0,125	0,881	0,117	0,825	0,122	0,860
C18	0,559	3,939	0,512	3,608	0,508	3,580
C18:1t	0	0	0	0	0	0
C18:1	9,347	65,87	9,345	65,86	9,922	69,92
C18:2	1,079	7,604	1,183	8,337	0,771	5,433
C18:3t	0	0	0	0	0	0
C18:3w3	0,132	0,930	0,153	1,078	0,099	0,698
C20	0	0	0	0	0	0
C20:3	0,278	1,959	0,287	2,023	0,209	1,473
C22	0	0	0	0	0	0
C23	0	0	0	0	0	0
NI*	0	0	0	0	0	0
Σ AGS	2,320	16,35	2,195	15,47	2,159	15,21
Σ AGMI (C16:1 + C18:1)	9,472	66,75	9,462	66,68	10,04	70,75
Σ AGPI (C18:2 + C20:3)	1,357	9,563	1,470	10,36	0,980	6,906
Σ AGT (C18:1t + C18:3t)	0	0	0	0	0	0
Σ AGw3	0,132	0,930	0,153	1,078	0,099	0,698
Σ NI*	0,910	6,413	0,910	6,413	0,910	6,413
Ácidos Graxos Totais	14,19	100	14,19	100	14,19	100

** SC – Formulação com adição de 150 mg/kg de sal de cura

C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C16:1 – ácido palmitoléico, C18 – ácido esteárico, C18:1t – ácido elaídico, C18:1 – ácido oléico, C18:2 – ácido linoléico (ω -6), C18:3w3 – ácido α -linolênico, C20- ácido araquídico, C20:3 – ácido eicosatrienóico, C22 – ácido behênico, C23 – ácido tricosanóico.

NI* - não identificado, Σ AGS – somatório de ácidos graxos saturados, Σ AGMI – somatório de ácidos graxos monoinsaturados, Σ AGPI – somatório de ácidos graxos poliinsaturados, Σ AGT – somatório de ácidos graxos trans, Σ AG ω 3 – somatório de ácidos graxos ômega 3, Σ NI* - somatório de ácidos graxos não identificados.

Tabela 15. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra F1 nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento

Amostras **						
F1						
Ácidos Graxos Totais	1 dia (g/100g)	%	90 dias (g/100g)	%	180 dias (g/100g)	%
C14	0,091	0,677	0,067	0,499	0,141	1,050
C16	1,703	12,68	1,692	12,60	1,559	11,61
C16:1	0,126	0,940	0,127	0,945	0,118	0,880
C18	0,564	4,196	0,540	4,019	0,516	3,843
C18:1t	0	0	0	0	0	0
C18:1	9,397	69,97	9,406	70,04	9,700	72,23
C18:2	1,059	7,888	1,119	8,330	0,892	6,642
C18:3t	0	0	0	0	0	0
C18:3w3	0,134	0,995	0,167	1,245	0,096	0,712
C20	0	0	0,053	0,392	0	0
C20:3	0,356	2,653	0,260	1,935	0,240	1,785
C22	0	0	0	0	0	0
C23	0	0	0	0	0	0
NI*	0	0	0	0	0,168	1,252
Σ AGS	2,358	17,56	2,352	17,51	2,216	16,50
Σ AGMI (C16:1 + C18:1)	9,523	70,91	9,534	70,99	9,818	73,11
Σ AGPI (C18:2 + C20:3)	1,415	10,54	1,379	10,27	1,132	8,427
Σ AGT (C18:1t + C18:3t)	0	0	0	0	0	0
Σ AGw3	0,134	0,995	0,167	1,245	0,096	0,712
Σ NI*	0	0	0,000	0	0,168	1,252
Ácidos Graxos Totais	13,43	100	13,43	100	13,43	100

** F1 – Formulação com adição de 100 mg/kg de nisina.

C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C16:1 – ácido palmitoléico, C18 – ácido esteárico, C18:1t – ácido elaídico, C18:1 – ácido oléico, C18:2 – ácido linoléico (ω -6), C18:3 ω 3 – ácido α -linolênico, C20- ácido araquídico, C20:3 – ácido eicosatrienóico, C22 – ácido behênico, C23 – ácido tricosanóico.

NI* - não identificado, Σ AGS – somatório de ácidos graxos saturados, Σ AGMI – somatório de ácidos graxos monoinsaturados, Σ AGPI – somatório de ácidos graxos poliinsaturados, Σ AGT – somatório de ácidos graxos trans, Σ AG ω 3 – somatório de ácidos graxos ômega 3, Σ NI* - somatório de ácidos graxos não identificados.

Tabela 16. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra F3 nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento

Amostras **						
F3						
Ácidos Graxos Totais	1 dia (g/100g)	%	90 dias (g/100g)	%	180 dias (g/100g)	%
C14	0,102	0,715	0	0	0,089	0,627
C16	1,704	11,95	1,804	12,65	1,677	11,76
C16:1	0,117	0,817	0,137	0,963	0,126	0,887
C18	0,641	4,498	0,575	4,030	0,554	3,884
C18:1t	0	0	0	0	0	0
C18:1	10,16	71,28	10,07	70,64	10,57	74,10
C18:2	1,129	7,918	1,172	8,221	0,925	6,484
C18:3t	0	0	0	0	0	0
C18:3w3	0,131	0,918	0,193	1,355	0,103	0,723
C20	0	0	0	0	0	0
C20:3	0,271	1,901	0	0	0,218	1,531
C22	0	0	0,306	2,145	0	0
C23	0	0	0	0	0	0
NI*	0	0	0	0	0	0
Σ AGS	2,447	17,16	2,352	18,83	2,320	16,27
Σ AGMI (C16:1 + C18:1)	10,28	72,10	9,534	71,60	10,69	74,99
Σ AGPI (C18:2 + C20:3)	1,400	9,819	1,379	8,221	1,143	8,015
Σ AGT (C18:1t + C18:3t)	0	0	0	0	0	0
Σ AGw3	0,131	0,918	0,167	1,355	0,103	0,723
Σ NI*	0	0	0,000	0	0	0
Ácidos Graxos Totais	14,26	100	14,26	100	14,26	100

** F3 – Formulação com adição de 300 mg/kg de nisina

C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C16:1 – ácido palmitoléico, C18 – ácido esteárico, C18:1t – ácido elaídico, C18:1 – ácido oléico, C18:2 – ácido linoléico (ω -6), C18:3 ω 3 – ácido α -linolênico, C20- ácido araquídico, C20:3 – ácido eicosatrienóico, C22 – ácido behênico, C23 – ácidotricosanóico.

NI* - não identificado, Σ AGS – somatório de ácidos graxos saturados, Σ AGMI – somatório de ácidos graxos monoinsaturados, Σ AGPI – somatório de ácidos graxos poliinsaturados, Σ AGT – somatório de ácidos graxos trans, Σ AG ω 3 – somatório de ácidos graxos ômega 3, Σ NI* - somatório de ácidos graxos não identificados.

Tabela 17. Resultado do perfil em ácidos graxos da amostra F5 nos tempos de 1, 90 e 180 dias de armazenamento

Amostras **						
F5						
Ácidos Graxos Totais	1 dia (g/100g)	%	90 dias (g/100g)	%	180 dias (g/100g)	%
C14	0	0	0	0	0,098	0,678
C16	1,736	12,03	1,802	12,49	1,699	11,77
C16:1	0,117	0,814	0,139	0,964	0,130	0,898
C18	0,654	4,533	0,569	3,946	0,557	3,858
C18:1t	0	0	0	0	0,067	0,467
C18:1	10,32	71,53	10,27	71,19	10,45	72,40
C18:2	1,143	7,918	1,185	8,214	0,947	6,562
C18:3t	0	0	0	0	0	0
C18:3w3	0,134	0,928	0,170	1,178	0,106	0,732
C20	0	0	0	0	0,051	0,352
C20:3	0,325	2,251	0,291	2,018	0,329	2,282
C22	0	0	0	0	0	0
C23	0	0	0	0	0	0
NI*	0	0	0	0	0	0
Σ AGS	2,390	16,56	2,371	16,44	2,405	16,66
Σ AGMI (C16:1 + C18:1)	10,44	72,34	10,41	72,15	10,58	73,30
Σ AGPI (C18:2 + C20:3)	1,468	10,17	1,476	10,23	1,276	8,844
Σ AGT (C18:1t + C18:3t)	0	0	0	0	0,067	0,467
Σ AG ω 3	0,134	0,928	0,170	1,178	0,106	0,732
Σ NI*	0	0	0	0	0	0
Ácidos Graxos Totais	14,43	100	14,43	100	14,43	100

** F5 – Formulação com adição de 500 mg/kg de nisina

C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C16:1 – ácido palmitoléico, C18 – ácido esteárico, C18:1t – ácido elaídico, C18:1 – ácido oléico, C18:2 – ácido linoléico (ω -6), C18:3 ω 3 – ácido α -linolênico, C20- ácido araquídico, C20:3 – ácido eicosatrienóico, C22 – ácido behênico, C23 – ácido tricosanóico.

NI* - não identificado, Σ AGS – somatório de ácidos graxos saturados, Σ AGMI – somatório de ácidos graxos monoinsaturados, Σ AGPI – somatório de ácidos graxos poliinsaturados, Σ AGT – somatório de ácidos graxos trans, Σ AG ω 3 – somatório de ácidos graxos ômega 3, Σ NI* - somatório de ácidos graxos não identificados.

Os resultados da análise de perfil em ácidos graxos das amostras comerciais embaladas em vidro (CV), em bisnaga (CB) e em lata (CL) são vistos na Tabela 18.

Tabela 18. Resultado do perfil em ácidos graxos das amostras CV, CB e CL

Ácidos Graxos Totais	Amostras **					
	CV (g/100g)	%	CB (g/100g)	%	CL (g/100g)	%
C14	0,145	1,031	0,155	0,963	0,122	0,876
C16	3,213	22,85	3,594	22,32	2,955	21,23
C16:1	0,532	3,784	0,573	3,559	0,472	3,391
C18	1,380	9,815	1,472	9,143	1,321	9,490
C18:1t	0	0	0	0	0	0
C18:1	5,445	38,73	6,727	41,78	4,749	34,12
C18:2	2,244	15,96	2,920	18,14	2,724	19,57
C18:3t	0	0	0	0	0,092	0
C18:3w3	0	0	0,139	0,863	0,178	1,279
C20	0	0	0	0	0	0
C20:3	0	0	0	0	0,073	0,524
C22	0	0	0	0	0	0
C23	0	0	0	0	0,156	0
NI*	1,100	7,824	0,520	0	1,082	0
Σ AGS	4,738	33,70	5,221	32,43	4,554	32,72
Σ AGMI (C16:1 + C18:1)	5,977	42,51	7,300	45,34	5,221	37,51
Σ AGPI (C18:2 + C20:3)	2,244	15,96	2,920	18,14	2,797	20,09
Σ AGT (C18:1t + C18:3t)	0	0	0	0	0,092	0,661
Σ AGw3	0	0	0,139	0,863	0,178	1,279
Σ NI*	1,100	7,824	0,520	0	1,082	7,773
Ácidos Graxos Totais	14,06	100	16,10	100	13,92	100

** CV – Amostra comercial embalada em vidro (60 dias de armazenamento), CB – Amostra comercial embalada em bisnaga (30 dias de armazenamento), CL – Amostra comercial embalada em lata (180 dias de armazenamento). Obs: as datas não se referem a validade do produto, e sim ao período decorrido da data de fabricação até a data da análise.

C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C16:1 – ácido palmitoléico, C18 – ácido esteárico, C18:1t – ácido elaídico, C18:1 – ácido oléico, C18:2 – ácido linoléico (ω -6), C18:3 ω 3 – ácido α -linolênico, C20- ácido araquídico, C20:3 – ácido eicosatrienóico, C22 – ácido behênico, C23 – ácido tricosanóico.

NI* - não identificado, Σ AGS – somatório de ácidos graxos saturados, Σ AGMI – somatório de ácidos graxos monoinsaturados, Σ AGPI – somatório de ácidos graxos poliinsaturados, Σ AGT – somatório de ácidos graxos trans, Σ AG ω 3 – somatório de ácidos graxos ômega 3, Σ NI* - somatório de ácidos graxos não identificados.

Os resultados mostraram que a adição dos conservadores (tanto o sal de cura como a nisina em diferentes concentrações) não influenciaram o perfil em ácidos graxos das formulações teste, uma vez que não foram verificadas alterações entre as mesmas nos diferentes tratamentos.

As amostras comerciais apresentaram maior concentração de ácidos graxos saturados (sendo 4,738g/100g para CV, 5,221g/100g para CB e 4,554g/100g para CL) do que as formulações teste (em média 2,349g/100g) e menores quantidades de ácidos graxos monoinsaturados (5,977g/100g para CV, 7,300g/100g para CB e 5,221g/100g para CL) do que as mesmas (em média 10,04g/100g). Estes resultados eram esperados, uma vez que as amostras comerciais apresentavam em sua composição gordura animal (informações contidas nos rótulos dos produtos), enquanto as formulações teste foram elaboradas com corte de frango magro (filezinho do peito), tendo praticamente como única fonte lipídica o azeite de oliva, rico em ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oléico.

A pequena concentração de ácido graxo trans C18:3t (0,092g/100g) encontrada na amostra comercial embalada em lata, pode ter sido ocasionada pela adição de gordura animal refinada e pelo fato da temperatura de cozimento poder ter alcançado 170°C. Nestas duas situações é possível haver formação de ácidos graxos trans. A maior ingestão de ácidos graxos trans está relacionada a um aumento da incidência de doenças cardiovasculares, sendo mediada pelo aumento do colesterol LDL, redução do colesterol HDL, aumento dos níveis da lipoproteína A e triglicerídeos no sangue) (HU; MANSON; WILLET, 2001; SALMER et al., 2001).

As concentrações de ácidos graxos saturados e poliinsaturados foram maiores nas amostras comerciais (4,838 g/100g e 2,654 g/100g, respectivamente) quando comparadas às amostras teste (2,366 g/100g e 1,333g/100g, respectivamente). Por outro lado, maiores concentrações de ácidos graxos monoinsaturados foram encontrados nas amostras teste, apresentando valores médios de 9,996g/100g quando comparadas às amostras comerciais cujos valores médios foram de 1,233g/100g. Porém, foram encontradas concentrações semelhantes de ácidos graxos da série ômega (ω) para as amostras teste e comerciais, apresentando valores médios de 0,132g/100g. Os ácidos graxos ω -3 estão naturalmente presentes em óleos vegetais, principalmente em óleos de milho, soja e girassol. Além da adição de gordura animal, os patês comerciais também continham óleos vegetais (informações nos rótulos) razão pela qual foram encontrados seus ácidos graxos nos mesmos. Dentre os ácidos graxos da série ω -3, destacam-se os ácidos linolênico, eicosapentaenoico e o docosahexaenóico, por exercerem importante papel na prevenção de doenças cardiovasculares, artrite, psoríase e até mesmo alguns tipos de câncer (DRUZIANI; MARCHESI; SCAMPARINI, 2007).

De acordo com Curi et al. (2002), os animais mamíferos necessitam da ingestão de ácidos graxos poliinsaturados oriundos da dieta, uma vez que não são capazes de sintetizá-los em sua maioria. Estes ácidos graxos são essenciais ao organismo.

Minozzo (2010) relatou valores totais de ácidos graxos saturados de 11,87g/100g, 13,63g/100g e 9,10g/100g para patês de tilápia, armado e flaminguinha, respectivamente valores totais de ácidos graxos monoinsaturados de 8,610g/100g, 3,220g/100g e 5,000g/100g de poliinsaturados de 5,520g/100g, 5,010g/100g e 7,050g/100g para os mesmos patês. Estes apresentavam teores médios de lipídios totais de 27,54%, 23,53% e 22,37% respectivamente para os patês supracitados.

4.1.6 Oxidação lipídica (Substâncias Reativas ao Ácido 2- Tiobarbitúrico: TBARS)

Os resultados das médias e erros-padrão das análises de TBARS e da análise para verificação de “*off flavour*” são vistas na Tabela 19.

Tabela 19. Médias* seguidas pelos erros padrão de TBARS em mg/kg de malonaldeído das amostras teste ao longo dos dias de estocagem

TBARS (mg/kg de malonaldeído)					
Dias de armazenamento					
Amostras**	1	60	120	180	Médias
FC	0,124 ^{Bb} ± 0,005	0,168 ^{Ca} ± 0,005	0,176 ^{Aa} ± 0,005	0,121 ^{Ab} ± 0,005	0,147 ^a ± 0,003
SC	0,116 ^{Cb} ± 0,005	0,034 ^{Ec} ± 0,005	0,138 ^{Ba} ± 0,005	0,103 ^{Bb} ± 0,005	0,098 ^c ± 0,003
F1	0,064 ^{Db} ± 0,005	0,065 ^{Db} ± 0,005	0,129 ^{Ba} ± 0,005	0,067 ^{Db} ± 0,005	0,081 ^d ± 0,003
F3	0,065 ^{Dc} ± 0,005	0,334 ^{Aa} ± 0,005	0,085 ^{Cb} ± 0,005	0,086 ^{Cb} ± 0,005	0,143 ^a ± 0,003
F5	0,146 ^{Ab} ± 0,005	0,242 ^{Ba} ± 0,005	0,066 ^{Dc} ± 0,005	0,054 ^{Dc} ± 0,005	0,127 ^b ± 0,003
Médias	0,103 ^C ± 0,002	0,169 ^A ± 0,002	0,119 ^B ± 0,002	0,086 ^D ± 0,002	

*Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade.** FC – sem conservadores, SC – Formulação com adição de 150 mg/kg de sal de cura, F1 – Formulação com adição de 100 mg/kg de nisina, F3 – Formulação com adição de 300 mg/kg de nisina, F5 – Formulação com adição de 500 mg/kg de nisina.

Os resultados médios mostraram que, apesar de ter havido diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos (formulações) e ao longo do tempo, os valores encontrados foram considerados baixos, quando comparados à valores relatados em outros trabalhos.

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de terem sido encontrados no perfil em ácidos graxos, baixos teores de ácidos graxos poliinsaturados contendo mais de duas insaturações na mesma cadeia (no caso C20:3), com valores médios totais de 0,272mg/100g. Além disso, o uso de antioxidante (ácido ascórbico) adicionado às formulações foi capaz de manter a estabilidade dos patês.

Quanto maior o número de insaturações, maior a susceptibilidade à oxidação lipídica. Uma vez oxidados, os lipídios podem vir a reagir com os demais componentes do produto como proteína, carboidratos e vitaminas (OLIVEIRA et al., 2007).

Produtos contendo sais de cura eventualmente podem apresentar valores mais elevados para TBARS em razão da presença de contaminantes minerais pró-oxidantes no mesmo. Porém na presente pesquisa, isto não foi observado.

Estudos sobre a evolução da oxidação lipídica de patês ao longo de 120 dias são bastante raros, uma vez que a vida útil destes produtos geralmente gira em torno de 60 dias. Isto dificultou a comparação com outros trabalhos.

Os valores isolados de TBARS não permitem uma avaliação mais concreta sobre o grau da oxidação lipídica e seus efeitos sobre as características do produto. Assim, é importante que esta análise seja realizada concomitantemente à análise sensorial específica para verificar se o valor encontrado em cada período de tempo se relaciona com a percepção de “*off flavour*” pelo consumidor.

Para que houvesse correlação com as análises para verificação de oxidação lipídica (TBARS), o teste de comparação múltipla para verificação de “*off flavour*” precisou ser realizado em tempos diferentes da mesma por questão de segurança, uma vez que as análises microbiológicas para F3 sob temperatura de refrigeração mostraram que esta apresentou vida útil inferior à 180 dias. Assim, pôde-se relacionar somente os dias 1, 60 e 120 dias de armazenamento.

As diferenças encontradas sensorialmente no patê ao longo de 120 dias de armazenamento pelo teste de diferença do controle são vistas na Figura 13.

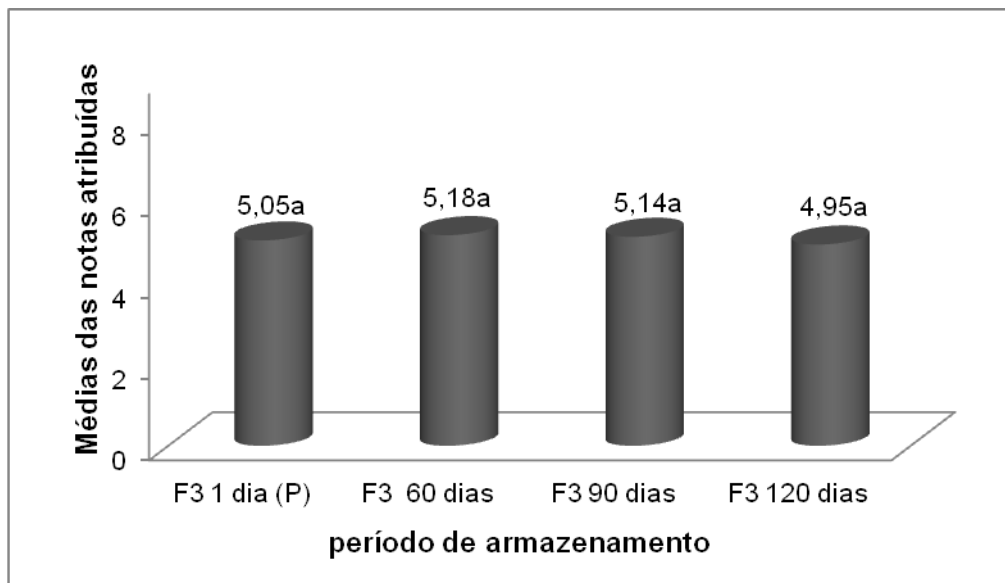


Figura 13. Teste de comparação múltipla para verificação de “*off flavour*”

Médias seguidas de letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Dunnet à 5% de significância, com Diferença Mínima Significativa (D.M.S) de 0,63 à nível de 5%.

Os resultados do teste de comparação múltipla para verificação de “*off flavour*” mostraram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o atributo sabor, sendo todas as amostras preferidas iguais a P (valores próximos a 5), o que era esperado em razão dos baixos valores encontrados na análise de TBARS ao longo dos períodos de armazenamento.

Martin et al. (2008) avaliaram o efeito da substituição parcial de gordura animal por azeite de oliva (alto teor de ácidos graxos monoinsaturados) e ácido linoléico conjugado (CLA, fonte de ácidos graxos poliinsaturados) sobre a estabilidade à oxidação lipídica de patês de fígado mantidos sob refrigeração à 4°C por 71 dias. Foram realizados três tratamentos: com adição de azeite de oliva (A), com adição de CLA (B) e com a mistura de ambos (C). Os três tratamentos apresentaram baixos teores de mg malonaldeído/kg de produto, semelhantes à presente pesquisa com patê de frango, indicando que o enriquecimento de patês de fígado com estes compostos não compromete a estabilidade à oxidação lipídica ao longo do período de armazenamento.

Schossler (2009) encontrou valores de TBARS ainda mais baixos em patês de presunto inoculados com cultura probiótica (*Bifidobacterium lactis*), relatando valores entre 0,013 a 0,017 mg/kg de malonaldeído.

Ao estudar o efeito da adição de globinas de origem bovina como agente emulsionante em patês de presunto, Silva et al. (2003) relataram valores mais elevados (entre 0,2 e 0,8mg/kg de TBARS) do que os encontrados na presente pesquisa. Contudo, os autores obtiveram teores de lipídios maiores no produto final (entre 24,40 e 25,35%) do que os encontrados nas formulações FC, SC, F1, F3 e F5 (entre 13,28 e 14,43%). Além de apresentarem maior teor de lipídios, a presença de íons ferro presentes nas globinas adicionadas pode ter favorecido as reações de oxidação lipídica, atuando como um pró-oxidante no meio. O teste sensorial pôde correlacionar as análises de TBARS, uma vez que foi relatado pelos provadores a percepção de sabor metálico quando as concentrações de

malonaldeído encontravam-se maiores nas amostras. Estévez et al. (2005) verificaram valores semelhantes à Silva et al. (2003) em patê de presunto elaborados com pernis oriundos de raças diferentes de suínos, encontrando valores entre 0,35 e 0,83 mg/kg de malonaldeído.

Uma vez que os valores analíticos de TBARS influenciam de forma diferente cada tipo de alimento, não há um padrão estabelecido para estes valores, sendo necessário correlacioná-los sempre com os resultados obtidos de testes sensoriais para avaliar se os valores encontrados foram capazes de alterar significativamente o sabor do produto.

As baixas concentrações nos valores de TBARS indicaram que, além do antioxidante adicionado (ácido ascórbico), os ingredientes utilizados na formulação dos patês (principalmente o azeite de oliva e o vinho tinto, rico em polifenóis) podem ter contribuído para a inibição das oxidações lipídicas, mantendo os patês estáveis por um longo período de armazenamento.

D'Arrigo et al. (2004) encontraram valores médios de TBARS entre 0,38 e 0,42mg/kg de malonaldeído em patês de fígado e gordura de suínos obtidos de diferentes dietas contendo ácidos graxos poliinsaturados. Ao avaliarem a adição de diferentes concentrações de gordura à patês de fígado, Estévez, Ventana e Cava (2005) encontraram valores de TBARS entre 5,56 mg/kg de malonaldeído em patês adicionados de 45% de gordura animal e 2,87 mg/kg de malonaldeído para patês contendo 35% de gordura animal. Estes últimos autores também realizaram teste sensorial (teste triangular) para verificação de “*off flavour*”, relatando que não houve percepção de alteração de sabor por parte dos provadores, semelhantemente ao encontrado na presente pesquisa.

Com o objetivo de substituir antioxidantes sintéticos por naturais, Marangoni e Moura (2011) avaliaram a evolução da oxidação lipídica através de TBARS em salame em 3 tratamentos: adicionado de 0,01% de óleo de coentro como antioxidante (A), 0,005% de óleo de coentro + 0,005% de BHT (B) e 0,01% de BHT (C) aos 1,7,14,21,28,35,42,63 e 91 dias de estocagem. As autoras concluíram que o tratamento A foi mais eficiente na inibição das reações de oxidação lipídica ao longo do tempo, encontrando valores de TBARS entre 0,0865 a 0,1448 mg/kg de malonaldeído.

As concentrações adicionadas de óleo essencial de coentro foram inferiores à presente pesquisa, em que também se utilizou um antioxidante natural, o ácido ascórbico (INS 300) na concentração média de 0,7%.

4.2 Resultados das Análises Microbiológicas

4.2.1 Determinação da vida útil dos patês

Os resultados de todas as amostras testadas, desde o tempo 1 até 180 dias de armazenamento, mantidas sob refrigeração ($8 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa de $75 \pm 5\%$ estavam de acordo com a Legislação vigente para as análises de: *Salmonella sp* (ausência em 25g); Estafilococos coagulase positivo ($< 1,0 \times 10^2$ UFC/g) e Coliformes termotolerantes ($< 3,0$ NMP/g). Também não foram detectados bolores e leveduras ($< 1,0 \times 10^2$ UFC/g); microorganismos mesófilos aeróbios ($< 1,0 \times 10^2$ UFC/g) e bactérias lácticas ($< 1,0 \times 10^2$ UFC/g).

O tratamento térmico aplicado e as condições higiênicas de processamento foram satisfatórios para inibir o crescimento de micro-organismos Gram-negativos, uma vez que a nisina isolada não possui ação efetiva sobre estes. A adição de suco de limão também pode ter contribuído para este resultado, podendo ter funcionado como agente quelante pela ação do ácido cítrico presente neste, além de ter auxiliado na redução do pH do meio, favorecendo a atuação da nisina.

Porém, foi detectada a presença de clostrídios sulfito redutores em tubos contendo SPS e selo vaspar em duplicata em diluição 10^{-1} na amostra FC aos 30 dias de armazenamento, aos 90 dias na amostra SC, aos 120 dias na amostra F1 e aos 180 dias na amostra F3. Não detectou-se contaminação com clostrídio sulfito redutor na amostra F5 ao final de 180 dias.

Os resultados referentes à análise de clostrídios sulfito redutores em ágar SPS são vistos na Figura 14.

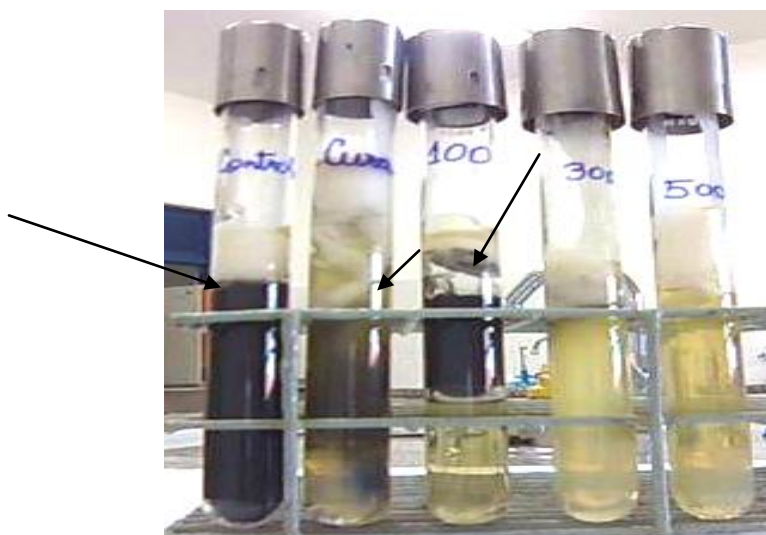


Figura14. Análise qualitativa de clostrídio sulfito redutor em meio SPS e selo vaspar, em diluição 10^{-1} aos 180 dias de armazenamento para as formulações FC (controle sem conservadores), SC (com 150mg/kg de sal de cura), F1 (com 100mg/kg de nisina), F3 (com 300mg/kg de nisina) e F5 (com 500mg/kg de nisina) mantidas em BOD à 36°C/48h. Observa-se enegrecimento e presença de gás (indicada pelas setas), principalmente nas amostras FC, SC e F1. O início do escurecimento pode ser observado na formulação F3. Já a formulação F5 apresentou-se totalmente límpida e sem presença de gás.

Os resultados foram confirmados quando realizados em placas inoculadas em profundidade contendo meio SPS em anaerobiose (jarra e disco gerador de anaerobiose). No momento da análise, as amostras contaminadas não apresentavam alterações visíveis (produção de gás), nem aroma ácido ou pútrido e nem mudança na coloração.

Pôde-se verificar que a nisina, principalmente nas concentrações de 300 e 500mg/kg dobrou a vida útil do produto, quando comparada à adição de 150 mg/kg de sal de cura. Porém os resultados mostraram que o sal de cura, nesta concentração, inibiu o crescimento de clostrídios sulfito redutores por um período superior a 60 dias. Os patês comerciais de aves acondicionados em embalagem similar (vidro) e armazenados sob as mesmas condições de refrigeração, apresentam vida útil média de 60 dias. Assim, a vida útil estabelecida pela indústria para os patês contendo sal de cura estão de acordo com o que foi verificado nesta pesquisa.

Os resultados encontrados para as amostras FC, SC, F1, F3 e F5 ao longo do tempo de armazenamento são vistos na Tabela 20.

Tabela 20. Resultados para as análises de clostrídios sulfito redutores em meio SPS ao longo do período de armazenamento

Amostras **	Dias de armazenamento					
	1	30	60	90	120	180
FC	<10	8,0x10 ²	*	*	*	*
SC	<10	<10	<10	5,5x10 ²	*	*
F1	<10	<10	<10	<10	4,2x10 ²	*
F3	<10	<10	<10	<10	<10	0,6 x10 ²
F5	<10	<10	<10	<10	<10	<10

* Análise não realizada por já ter sido detectada contaminação anterior.

** FC- formulação controle, sem adição de conservadores, SC – com adição de 150 mg/kg de sal de cura, F1 – com adição de 100mg/kg de nisina, F3 – com adição de 300mg/kg de nisina, F5 – com adição de 500mg/kg de nisina.

As colônias encontradas nas placas das amostras FC, SC, F1 e F3 foram submetidas à prova da catalase (-) e coloração de Gram. Os resultados observados pela coloração de Gram são vistos nas Figuras 15, 16 e 17. Observou-se na formulação controle (FC) células com esporo subterminal em forma de raquete características de *Clostridium botulinum*. Nas amostras contendo sal de cura (SC) ou nisina (F1 e F3) foi observada esporulação maciça.

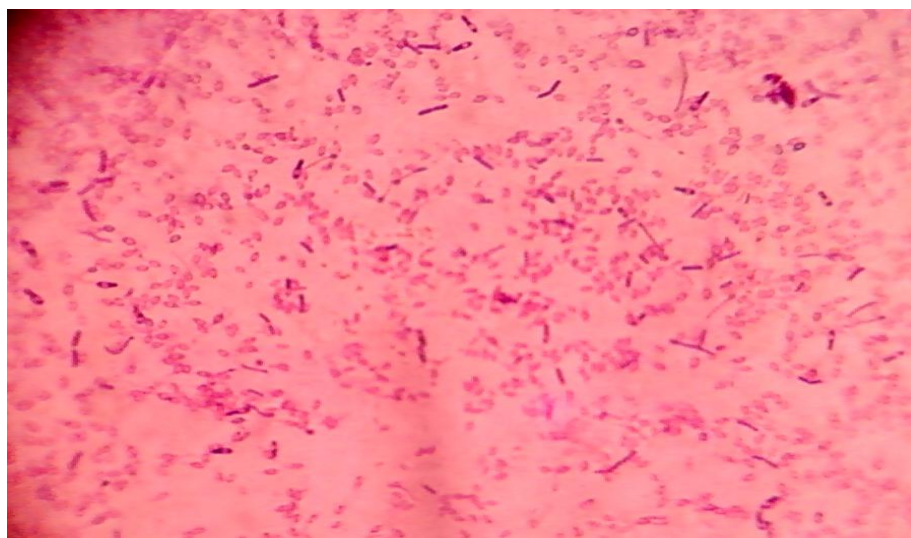


Figura 15. Esporos de *Clostridium sp* encontrados em patê FC (sem conservadores) em meio SPS aos 30 dias de armazenamento sob temperatura de refrigeração de 8±2°C (observação em microscópio óptico com objetiva de 100 x). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

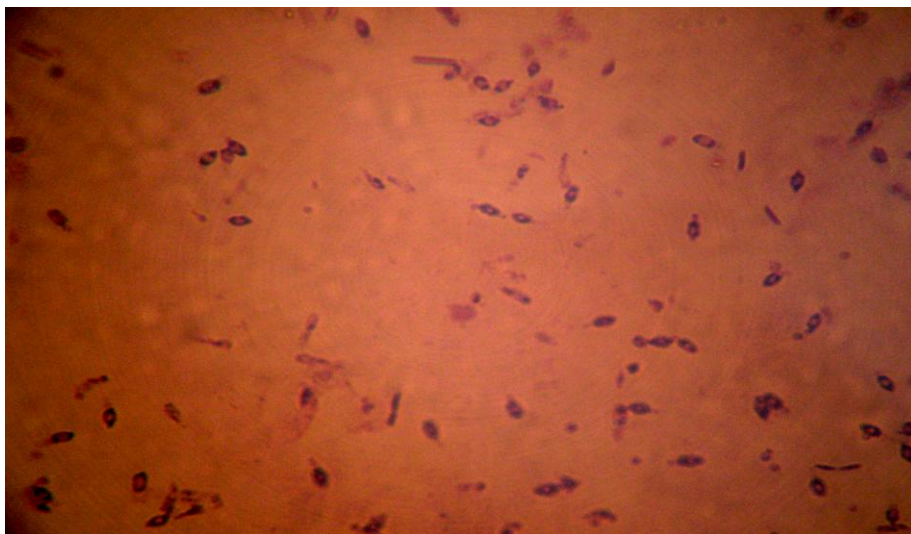


Figura 16. Esporos de *Clostridium sp* encontrados em patê SC (adicionado de 150 mg/Kg de sal de cura) em meio SPS aos 90 dias de armazenamento sob temperatura de refrigeração de $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ (observação em microscópio óptico com objetiva de 100 x). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

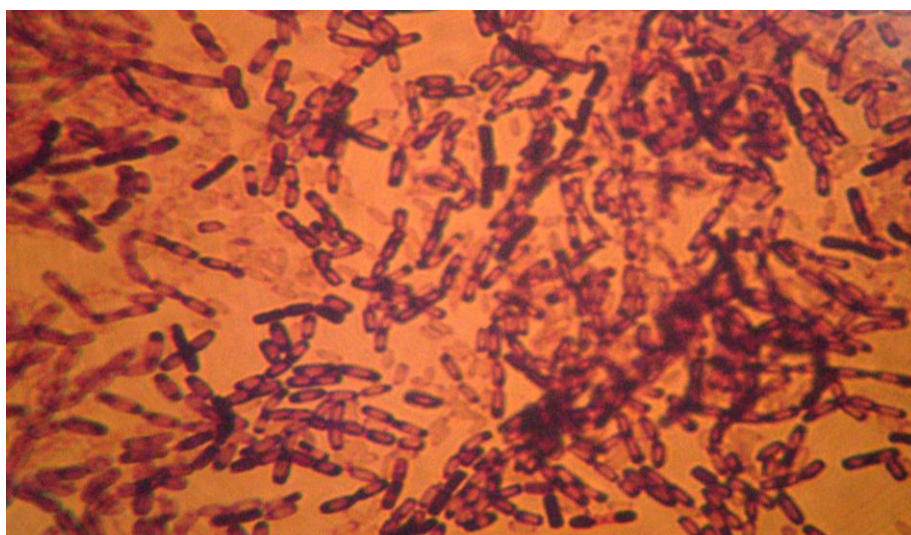


Figura 17. Esporos de *Clostridium sp* encontrados em patê F1 e F3 (adicionados de 100 e 300 mg/kg de nisina respectivamente) em meio SPS aos 120 e 180 dias de armazenamento respectivamente sob temperatura de refrigeração de $8\pm 2^{\circ}\text{C}$ (observação em microscópio óptico com objetiva de 100 x). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

4.2.2 Teste microbiológico qualitativo em temperatura abusiva de 36 e 55°C

Após incubação por 10 dias em BOD à 36°C e 7 dias à 55°C, os potes de patê não apresentaram sinais de contaminação visíveis (produção de gás em nenhuma das temperaturas de incubação). Abertas as embalagens para realização dos testes, também não foi detectado aroma estranho ou mudança de coloração em ambas as temperaturas de incubação. Procedeu-se então à análise, adicionando cerca de 2g de cada amostra em caldo de carne cozida e selo vaspar sendo mantidas à 36°C por 10 dias e 55°C por 4 dias para pesquisa de anaeróbios e caldo PBC para aeróbios mantido sob as mesmas condições de temperatura.

4.2.2.1 Resultado do teste em Caldo de Carne Cozida e selo Vaspar

Após incubação por 7 dias a 36°C, antes do término do período pré determinado de 10 dias, os tubos contendo caldo de carne + vaspar, apresentaram indício de contaminação, com presença abundante de gás e turbidez do caldo de carne nas amostras FC e SC, conforme visto na Figura 18.

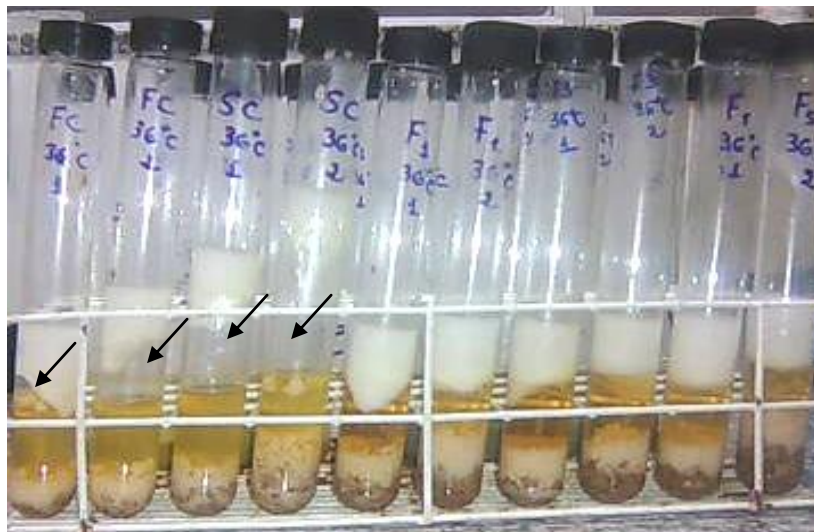


Figura 18. Teste qualitativo de incubação para as amostras FC (controle sem conservadores), SC (com 150mg/kg de sal de cura), F1 (com 100mg/kg de nisina), F3 (com 300mg/kg de nisina) e F5 (com 500mg/kg de nisina). Tubos em meio de caldo de carne e selo vaspar incubados em BOD à 36°C/7 dias. Observam-se evidências de contaminação das amostras FC e SC (turbidez do meio aquoso e presença de gás indicada pelas setas). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello.

As amostras turvas e com presença de gás (FC e SC) foram estriadas em ágar- extrato de fígado em pó e incubadas em BOD à 36°C por 4 dias em aerobiose e anaerobiose.

Observou-se crescimento tanto nas placas incubadas em anaerobiose quanto naquelas incubadas em aerobiose. As colônias das placas incubadas em aerobiose foram coradas (coloração de Gram) e testadas para catalase (+). Ao serem examinadas ao microscópio, apresentaram-se como bastonetes Gram positivos com esporos centrais, sem deformação do corpo bacteriano (Figuras 19 e 20), concluindo tratar-se de micro-organismos do gênero *Bacillus*.

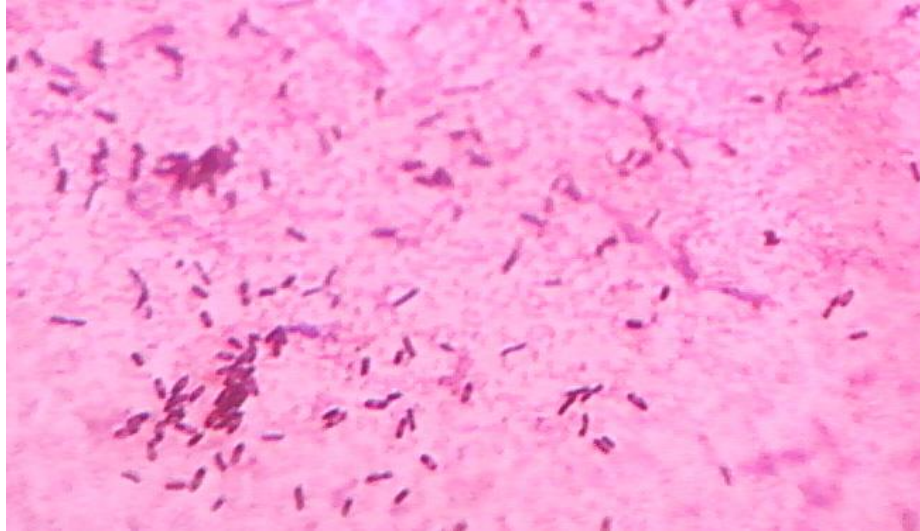


Figura 19. *Bacillus sp* e seus esporos encontrados em patê FC (sem conservadores) estriado em ágar extrato de fígado em pó mantido em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose, provenientes dos tubos contendo caldo de carne cozida + selo vaspar (teste de incubação à 36°C/7 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia de Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.



Figura 20. *Bacillus sp* e seus esporos encontrados em patê SC (contendo 150 mg/kg de sal de cura) estriado em ágar extrato de fígado em pó mantido em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose, provenientes dos tubos contendo caldo de carne cozida + selo vaspar (teste de incubação à 36°C/7 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia de Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

Para as placas incubadas em anaerobiose, realizou-se o teste da catalase (-), além do exame microscópico do esfregaço das colônias coradas (coloração de Gram) que revelou serem bastonetes Gram (+) conforme vistos nas Figuras 21 e 22.



Figura 21. *Clostridium sp* e seus esporos encontrados em patê FC (sem conservadores) estriado em ágar extrato de fígado em pó mantido em BOD à 36°C/4 dias em anaerobiose, provenientes dos tubos contendo caldo de carne cozida + selo vaspar (teste de incubação à 36°C/7 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia de Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

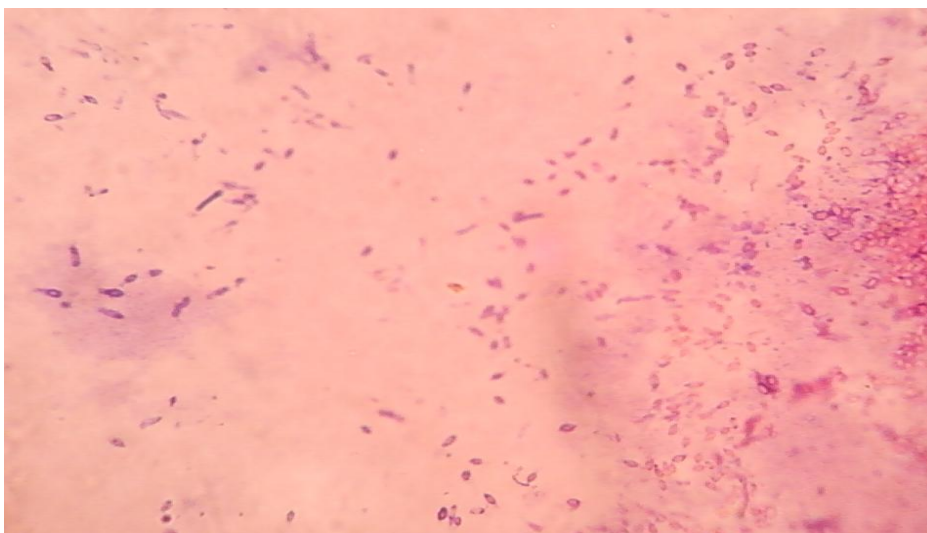


Figura 22. *Clostridium sp* e seus esporos encontrados em patê SC (contendo 150 mg/kg de sal de cura) estriado em ágar extrato de fígado em pó mantido em BOD à 36°C/4 dias em anaerobiose, provenientes dos tubos contendo caldo de carne cozida + selo vaspar (teste de incubação à 36°C/7 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia de Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

Após 10 dias, não foi observada contaminação em nenhuma das amostras nos tubos contendo caldo de carne e vaspar mantidos à 55°C. Porém, nos tubos incubados a 36°C observou-se contaminação também na amostra F1, enquanto F3 e F5 permaneceram inalteradas.

Os tubos de caldo de carne contendo F1 foram então estriados em placas contendo ágar extrato de fígado sendo mantidas em aerobiose e anaerobiose à 36°C/4 dias.

As colônias encontradas foram submetidas à coloração de Gram (+) e prova da catalase, sendo positiva para as colônias das placas incubadas em aerobiose e negativa para as incubadas em anaerobiose.

Morfológicamente, a coloração de Gram mostrou que as células encontradas nas placas incubadas em aerobiose eram bastonetes Gram positivos com esporo central, enquanto aquelas das placas incubadas em anaerobiose apresentaram esporo terminal em forma de raquete como vistos nas Figuras 23 e 24 respectivamente.

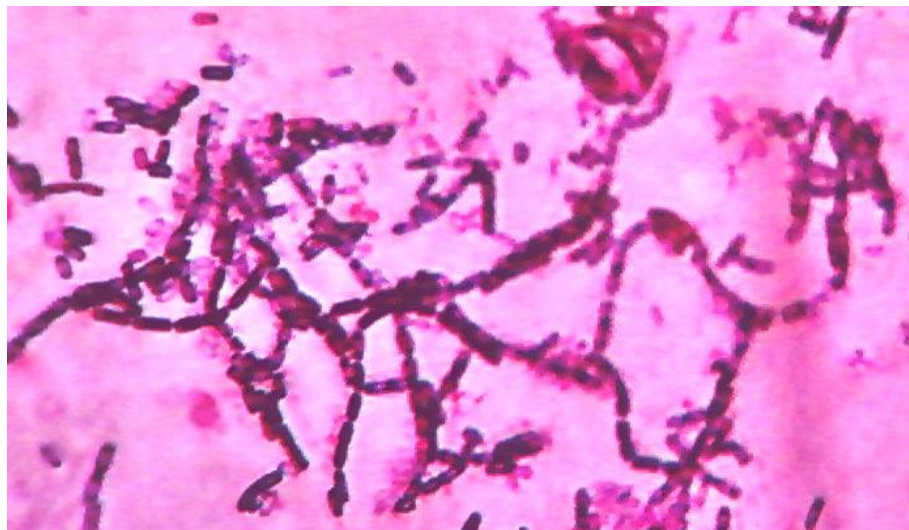


Figura 23. *Bacillus sp* e seus esporos encontrados em patê F1 (adicionado de 100mg/kg de nisina) estriado em ágar extrato de fígado em pó em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose, provenientes dos tubos contendo caldo de carne cozida + selo vaspar (teste de incubação à 36°C/10 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.



Figura 24. *Clostridium sp* e seus esporos encontrados em patê F1 (adicionado de 100mg/kg) estriado em ágar extrato de fígado em pó em BOD à 36°C/4 dias em anaerobiose, provenientes dos tubos contendo caldo de carne cozida + selo vaspar (teste de incubação à 36°C/10 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

4.2.2.2 Teste em Caldo Púrpura de Bromocresol (PBC)

As amostras que apresentaram contaminação em caldo de carne cozida também apresentaram-se contaminadas em caldo PBC, inclusive no mesmo tempo (7 dias) e temperatura (36°C) de incubação (Figura 25).

Ao término do período pré-determinado (10 dias) detectou-se contaminação também na amostra F1, não havendo contaminação em F3 e F5.



Figura 25. Teste qualitativo de incubação em caldoPBC com as amostras FC (controle sem conservadores), SC (com 150mg/kg de sal de cura), F1 (com 100mg/kg de nisina), F3 (com 300mg/kg de nisina) e F5 (com 500mg/kg de nisina) incubados em BOD à 36°C/7 dias. Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello.

As amostras contaminadas foram então estriadas em ágar nutriente manganês (ANMn) e incubadas à 36°C/4 dias em BOD. As colônias de ambas as amostras foram coradas (coloração de Gram) e testadas para catalase (+). A observação microscópica revelou a presença de bacilos com esporos centralizados. A forma de esporos predominou sobre a forma vegetativa em ambas as amostras (Figuras 26 e 27). Da mesma forma, na amostra F1 ao 10º dia de incubação observou-se a presença maciça de formas esporuladas (Figura 28).

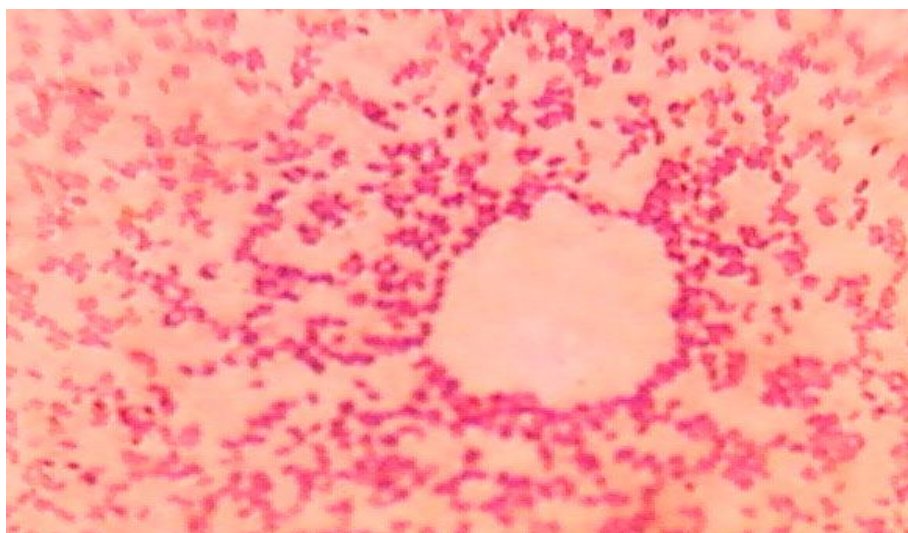


Figura 26. *Bacillus sp* e seus esporos encontrados em patê controle FC (sem conservadores) estriado em ágar nutriente manganês (ANMn) mantido em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose, provenientes dos tubos contendo PBC (teste de incubação à 36°C/10 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

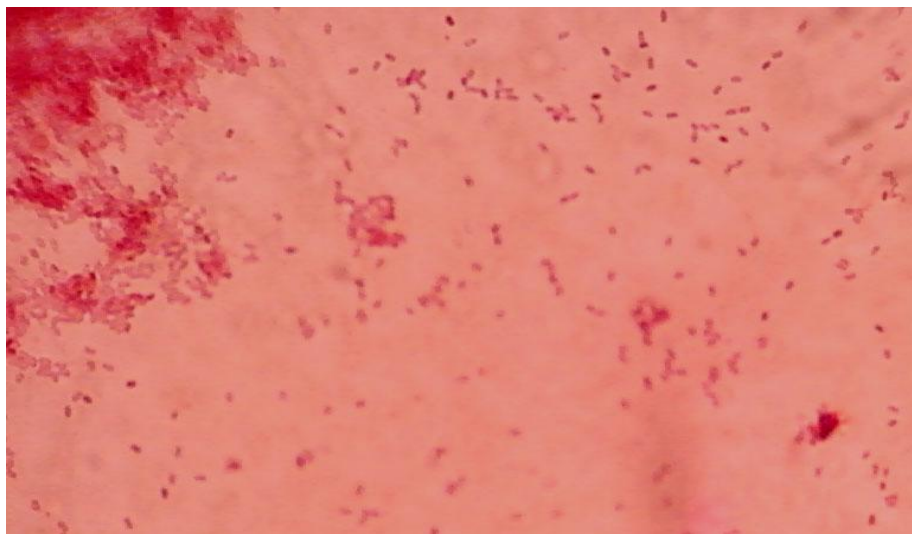


Figura 27. *Bacillus sp* e seus esporos encontrados em patê SC (contendo 150 mg/kg de sal de cura) estriado em ágar nutriente manganês (ANMn) mantido em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose, provenientes dos tubos contendo PBC (teste de incubação à 36°C/10 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

Não foi detectada contaminação em nenhuma das amostras incubadas à 55°C após 10 dias de incubação.

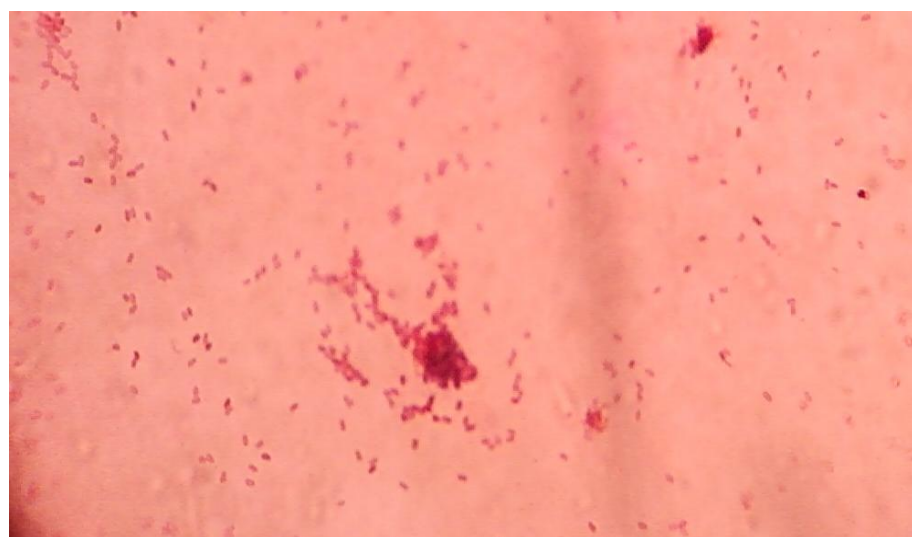


Figura 28. *Bacillus sp* e seus esporos encontrados em patê F1(contendo 100mg/kg) estriado em ágar nutriente manganês (ANMn) em BOD à 36°C/4 dias em aerobiose, provenientes dos tubos contendo PBC (teste de incubação à 36°C/10 dias - observação em microscópio óptico em objetiva de 100 x). Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello e André Fioravante.

Jay (2005) relata que os condimentos podem consituir-se em um meio de veiculação de esporos bacterianos. Uma vez que os condimentos utilizados não eram provenientes de fontes irradiadas, foram realizados os mesmos testes qualitativos utilizados para os patês, na pimenta branca, no alho granulado e na cebola em pó. Os resultados mostraram que de fato, a pimenta foi um importante veículo de contaminação, sendo comprovada visualmente pela

mudança na coloração roxa do caldo PBC para amarelo clara e produção intensa de gás nos tubos contendo caldo de carne cozida, com menos de 24h da inoculação nos meios. Porém não foi observada contaminação no alho granulado e cebola em pó após 10 dias de incubação. A observação microscópica dos tubos de caldo de carne cozida revelou a presença de bastonetes com esporos subterminais que sugerem a presença de *Clostridium botulinum* (marcados com setas na Figura 29). O resultado da prova da catalase (-) confirmou a presença de bactérias do gênero *Clostridium*.

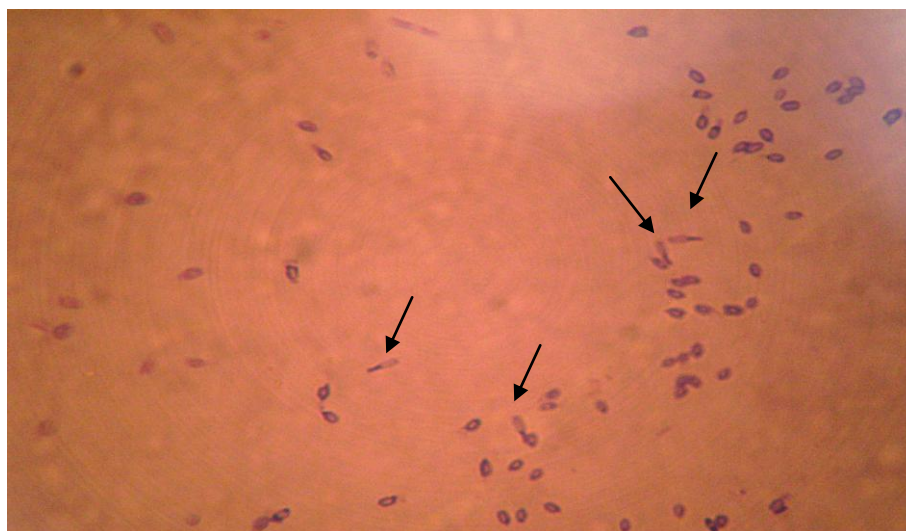


Figura 29. Esporos de *Clostridium sp* encontrados em pimenta branca de marca comercial não estéril, em meio ágar caldo de fígado e vaspar mantidas em anaerobiose em BOD à 36°C com menos de 24h.

4.2.3 Challenge testing com *Clostridium botulinum* em temperatura abusiva de 30°C

Quando os patês foram inoculados com *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397) na concentração de 100 esporos/g e incubados a 30°C, observou-se comportamento semelhante ao verificado nos testes qualitativos realizados após pré-incubação dos patês a 36°C, quando houve contaminação após 7 dias de incubação.

A formulação SC, contendo sal de cura na concentração de 150 mg/kg não foi capaz de inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*, mostrando-se alterada aos 7 dias de incubação após inoculação. De maneira similar, quando monitorou-se a contaminação dos patês mantidos sob refrigeração a 8°C, a adição de 150 mg/kg de sal de cura não foi suficiente para garantir a segurança do produto por mais de 60 dias, já que aos 90 dias de armazenamento foi constatada contaminação com Clostrídio Sulfito Redutor.

Assim ao 7º dia de incubação, as amostras controle inoculado (Ci) e SC apresentavam-se nitidamente contaminadas, com abaulamento significativo nas tampas e produção visível de gás no corpo do produto, além de aroma pútrido e repugnante extremamente forte, exalado no momento da abertura das embalagens. Estas amostras seriam facilmente identificadas pelos consumidores como produto não apto ao consumo na prateleira do supermercado ou em seus domicílios. Portanto, como a temperatura de incubação era apropriada, a bactéria certamente atingiu uma densidade populacional elevada e os produtos da atividade proteolítica alteraram completamente o odor, a aparência e a textura dos patês. Por outro lado, quando o produto foi mantido sob refrigeração a 8°C, a contaminação com clostrídio sulfito

reduzida foi detectada somente aos 90 dias de armazenamento. A baixa densidade populacional detectada (aproximadamente 1×10^2 UFC/g) não permitiu que houvesse alterações sensoriais perceptíveis no mesmo.

A amostra F1 apresentou leve abaulamento na tampa e no corpo do produto aos 10 dias de incubação, podendo passar despercebido pelo consumidor no momento da compra. Porém, no momento da abertura da embalagem, esta exalou aroma pútrido, indicando que o produto não estava apto ao consumo.

As Figuras 30a a 30f mostram o aspecto visual dos patês C, Ci, SC, F1, F3 e F5 dentro da embalagem, aos 10 dias de inoculação mantidas à temperatura abusiva de 30°C.



Figura 30a. Comparação visual entre os potes de patê C (controle sem conservadores, sem inoculação) e Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) após 10 dias incubados em BOD à 30°C (vista superior). Observa-se visível estufamento e amassamento da tampa em Ci. Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello.



Figura 30b. Comparação visual entre os potes de patê C (controle sem conservadores, sem inoculação) e Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397 - vista frontal)) após 10 dias incubados em BOD à 30°C. Observa-se visível estufamento na tampa e produção de gás em Ci, enquanto C permaneceu inalterada. Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello.



Figura 30c. Comparação visual entre os potes de patê Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) e F1 (com adição de 100mg/kg de nisina, inoculado com 100esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) após 10 dias incubados em BOD à 30°C. Observa-se visível estufamento nas tampas e produção de gás em ambas as amostras. Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello.



Figura 30d. Comparação visual entre os potes de patê Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) e F3 (com adição de 300mg/kg de nisina, inoculado com 100esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) após 10 dias incubados em BOD à 30°C. Observa-se visível estufamento na tampa e produção de gás em Ci, enquanto F3 permaneceu inalterada. Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello.



Figura 30e. Comparação visual entre os potes de patê Ci (controle sem conservadores, inoculado com 100 esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) e F5 (com adição de 500mg/kg de nisina, inoculado com 100 esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) após 10 dias incubados em BOD à 30°C. Observa-se visível estufamento na tampa e produção de gás em Ci, enquanto F5 permaneceu inalterada. Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello.



Figura 30f. Comparação visual entre os potes de patê SC (com adição de 150mg/kg de sal de cura, inoculado com 100 esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) e F5 (com adição de 500mg/kg de nisina, inoculado com 100 esporos/g de *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC 19397)) após 10 dias incubados em BOD à 30°C. Observa-se visível estufamento na tampa e produção de gás em SC, enquanto F5 permaneceu inalterada. Créditos: Flávia De Floriani Pozza Rebello.

De acordo com Roberts e Smart (1976), esporos de *Clostridium botulinum* podem eventualmente estar presentes em carnes cruas e também em produtos minimamente processados, uma vez que estes esporos são relativamente resistentes à temperaturas de pasteurização, à cura, à baixa atividade de água e à alta concentração de sal (HAUSCHILD;

HILSHEIMER, 1980). Assim, embora incapazes de germinar e se multiplicar, sobrevivem em condições adversas quando na sua forma esporulada.

Além do aspecto visual das embalagens de patê, foi realizado teste quantitativo em meio SPS, ao longo de 7, 10, 14, 21 e 28 dias de incubação. As placas foram mantidas em jarras de anaerobiose em BOD à 36°C durante 48h.

Foi observada contaminação em Ci e SC aos 7 dias de incubação, em F1 aos 10 dias de incubação e em C aos 14 dias de incubação, enquanto F3 e F5 mantiveram-se inalteradas até os 28 dias finais do experimento, com aspecto visual idêntico ao apresentado nas figuras anteriores aos 10 dias de incubação. Os resultados são vistos na Tabela 21.

Tabela 21. Resultados do *Challenge testing* com *Clostridium botulinum* ao longo do tempo à 30°C.

Tratamentos **	Dias decorridos após inoculação				
	7	10	14	21	28
C	<10	<10	4,0 x 10 ³	*	*
Ci	2,0 x 10 ³	*	*	*	*
SC	1,3 x 10 ⁴	*	*	*	*
F1	<10	5,5 x 10 ⁵	*	*	*
F3	<10	<10	<10	<10	<10
F5	<10	<10	<10	<10	<10

* Análise não realizada por já ter sido detectada contaminação anterior.

** C - controle sem adição de conservadores e sem inoculação; Ci - controle sem dição de conservadores inoculado com 100 esporos/g; SC – com adição de 150 mg/kg de sal de cura; F1 – com adição de 100mg/kg de nisina; F3 – com adição de 300mg/kg de nisina; F5 – com adição de 500mg/kg de nisina.

A amostra C (controle sem adição de conservadores e sem inoculação) apresentou contaminação aos 14 dias porque a pimenta utilizada na formulação estava naturalmente contaminada com esporos de clostrídios. Verificou-se que a formulação contendo 150 mg/kg de sal de cura apresentou um número maior de colônias do que a amostra Ci, indicando que a subdose de aditivos pode atuar de forma antagônica, favorecendo ainda mais o crescimento microbiano pela exclusão de micro-organismos competidores. O mesmo comportamento pôde ser verificado na formulação F1 contendo 100 mg/kg de nisina, que embora tenha retardado o crescimento de clostrídios, atingiu contagens mais elevadas aos 10 dias quando comparadas àquelas obtidas com Ci aos 7 dias, após vencer a injúria provocada pelo conservador. Aos 28 dias de incubação, as amostras F3 e F5 não apresentaram contaminação, mostrando que à partir de 300mg/kg de nisina houve um efeito bactericida sobre os patês inoculados.

Em uma outra pesquisa objetivando conhecer os efeitos das variações de temperatura sobre a concentração de nitrito necessária para inibir o *Clostridium botulinum* e suas toxinas, Christiansen et al. (1973) avaliaram presuntos formulados com concentrações de nitrito entre 0 e 500 mg/kg e entre 0 e 2.000 mg/kg (nos presuntos inoculados com uma mistura de esporos de 5 tipos de *Clostridium botulinum* tipo A e 5 do tipo B, utilizando concentrações de esporos de 100 a 10.000 esporos/g de produto). Os presuntos inoculados foram mantidos em temperatura de refrigeração à 7°C e abusiva de 27°C. Em apenas três dias em temperatura de 27°C, estes autores observaram que houve um decréscimo nos níveis de nitrito, de 150 mg/kg para 66 mg/kg, sendo que aos 28 dias a concentração de nitrito residual chegou a apenas 6 mg/kg. Nesta concentração de nitrito, foi detectada produção de toxina botulínica nos presuntos inoculados com 100 esporos/g da mistura de *Clostridium botulinum*. Porém a

produção de toxina foi inibida quando a concentração de nitrito adicionada aumentou para 200 mg/kg. Para os presuntos inoculados com 5.000 esporos/g e mantidos à 27°C, somente a adição de 500 mg/kg de nitrito foi capaz de inibir a produção de toxina botulínica.

Testes para detecção da toxina botulínica não foram realizados na presente pesquisa, pela necessidade de kits específicos bastante dispendiosos e pela ausência de um biotério, sendo inferido que provavelmente houve produção de toxina botulínica nas amostras com resultados de contaminação confirmados, uma vez que foram encontradas células vegetativas e esporos nas lâminas observadas ao microscópio. De qualquer maneira, a simples presença de *C. botulinum* no produto alimentício é absolutamente inadmissível considerando a gravidade da doença causada por este micro-organismo.

Com relação aos presuntos inoculados com a menor concentração de esporos (100 esporos/g) e mantidos sob refrigeração à 7°C, Christiansen et al. (1973) observaram que a adição de 150 mg/kg de nitrito inibiu a produção de toxina botulínica. Porém, mesmo sob refrigeração, houve um decréscimo significativo na concentração de nitrito adicionada, de 150 mg/kg para 84 mg/kg em apenas três dias de armazenamento, apresentando níveis residuais de nitrito de apenas 35 mg/kg ao final de 28 dias de armazenamento.

De acordo com os autores, a redução dos níveis de nitrito iniciou-se já no processo de cozimento dos presuntos, havendo perdas sucessivas ao longo dos períodos de armazenamento, sendo mais significativas quando os produtos foram submetidos à temperaturas mais elevadas, acima da temperatura de refrigeração.

Serrano e Junqueira (1991) avaliaram o efeito da temperatura sobre a concentração residual de nitrato e nitrito no produto final em patê de frango formulado com 96,00 mg/kg de nitrito de sódio e 48,00 mg/kg de nitrato de sódio. Os autores verificaram que, logo após o processamento, a concentração de nitrito de sódio havia sido reduzida no produto para 70,25 mg/kg. Os patês em seguida foram armazenados em temperatura de 25 e 35°C por 4 semanas. Ao final de 4 semanas, a determinação de nitrito foi novamente realizada, mostrando que a concentração de nitrito residual era de 15,50 mg/kg à 25°C e 11,00 mg/kg à 35°C. Estes mesmos autores avaliaram também o efeito da inoculação de *Clostridium botulinum* tipos A (ATCC25763) e B (ATCC7949) na concentração de 100 esporos/g de massa de patê crua. Após inoculação, os autores submetem a massa embalada em bisnaga à tratamento térmico de 95 a 100°C/30 minutos, seguindo-se ao resfriamento da mesma. Os patês prontos foram armazenados à 25 e 35°C durante 4 semanas, sendo realizados testes para detecção da toxina botulínica nos períodos de ½, 1, 1 ½, 2, 3 e 4 semanas. As amostras de patê mantidas à 35°C apresentaram contaminação por toxina botulínica em 1 semana (7 dias) de armazenamento, quando também foi observada a redução de nitrito anteriormente mencionada. Porém, não foi detectada presença de toxina botulínica nos patês armazenados à 25°C após 4 semanas.

Os resultados encontrados por Christiansen et al. (1973) e Serrano e Junqueira (1991) foram muito semelhantes à presente pesquisa, detectando-se contaminação por *Clostridium botulinum* nas amostras de patê contendo 150 mg/kg de sais de cura (SC) inoculadas com 100esporos/g após 7 dias de armazenamento à 30°C.

Estes dados são bastante alarmantes, uma vez que os sais de nitrato e nitrito são amplamente utilizados pela indústria de carnes, mostrando que oscilações de temperatura ocorridas durante o período de armazenamento podem vir a comprometer gravemente a sanidade dos produtos curados antes do fim de sua vida útil.

Conscientes deste risco, as indústrias podem estar utilizando concentrações mais elevadas de sais de cura, a fim de garantir a qualidade microbiológica destes produtos.

Desta forma, os consumidores podem estar sendo expostos à dois riscos igualmente preocupantes: de um lado as falhas no processamento, através da adição de condimentos contaminados e/ou do processamento térmico insuficiente e/ou de falhas na cadeia de frio possibilitariam o crescimento de *Clostridium botulinum* e a produção de suas toxinas. De

outro lado, o excesso da utilização de nitrito de sódio, além de causar problemas relacionados ao consumo exagerado de íons sódio, poderia favorecer a formação de nitrosaminas e potencializar o surgimento de tumores, além de metahemoglobinemia (OKAFOR; OGBONNA, 2003).

Com o objetivo de verificar como estavam as condições dos produtos curados processados e comercializados em algumas regiões do Brasil, foi feito um apanhado de trabalhos envolvendo as concentrações residuais de nitrato e nitrito de sódio.

Melo Filho; Biscontini e Andrade (2004) avaliaram o teor residual de nitrito e nitrato em salsichas inspecionadas provenientes das regiões Sul e Nordeste, comercializadas em supermercados da região metropolitana de Recife. Estes autores encontraram uma concentração de nitrito acima do máximo permitido em 18% do total de amostras. Com relação aos teores de nitrato, 17% das salsichas provenientes da região Sul encontravam-se acima do limite máximo de 300mg/kg, enquanto nas provenientes da região Nordeste, este percentual chegou a 67%.

Duarte (2010) verificou a concentração de nitrito de sódio em linguças do tipo frescal e cozida comercializadas no Estado do Rio de Janeiro. De um total de 60 amostras não inspecionadas e inspecionadas em âmbito Federal, Estadual e Municipal, a autora verificou que 21,7% apresentaram teor médio de nitrito residual entre 170 a 466 mg/kg acima do permitido pela legislação (150 mg/kg) no produto acabado, sendo que 18,4% eram linguças não inspecionadas e 3,4% eram inspecionadas.

Daguer et al. (2011) avaliaram a concentração de nitrito residual em vários produtos cárneos curados fabricados sob inspeção federal no Estado do Paraná. Estes autores encontraram uma concentração variável de nitrito entre as amostras analisadas, de 3,7 a 1.398,5 mg/kg, sendo que 18,4% das amostras encontravam-se muito acima do limite máximo permitido, apresentando valores médios de 395,91 mg/kg.

Este cenário mostra que a adição de nitrato e nitrito de sódio está sendo utilizada em concentrações danosas à saúde do consumidor, em várias regiões do país, mesmo em estabelecimentos com inspeção federal. Assim, medidas imediatas devem ser tomadas a fim de solucionar esta problemática, de modo a substituir os sais de cura por conservadores que não causem danos à saúde do consumidor, não alterem a qualidade sensorial do produto e assegurem sua qualidade microbiológica.

O uso de antimicrobianos naturais como a nisina pode ser uma alternativa para resolver esta questão, uma vez que diversos estudos mostraram sua eficácia na inibição de diversos micro-organismos, inclusive *Clostridium botulinum*.

Por ser um peptídeo, produzido por bactérias naturalmente presentes em produtos fermentados, a nisina não é considerada tóxica, sendo facilmente degradada por enzimas presentes na saliva e no estômago, mesmo em maiores concentrações, apresentando uma dose aceitável de 33.000 UI/kg de peso corpóreo, ou 0,825mg (SCHULZ et al., 2003).

De acordo com Cleveland et al. (2001), a DL₅₀ da nisina é de 6.950mg/kg, sendo portanto semelhante à DL₅₀ do cloreto de sódio (sal comum), ao ser administrado por via oral. Estes mesmos autores relatam que após 1 minuto da ingestão de chocolate ao leite contendo nisina, somente foi encontrada na saliva humana, 1/40 de sua atividade original.

Alguns estudos mostraram que a nisina é eficaz na inibição de *Clostridium botulinum* quando associado aos sais de cura em pH levemente ácidos (TAYLOR et al., 1985 (em salsichas de frango com pH entre 5,9 e 6,2); RAYMAN; ARIS; HURST, 1981 (em extrato de carne suína com pH 5,5)).

Porém, o uso da nisina associado aos sais de cura pode fazer com que o problema reincida. Uma vez que a nisina possui um custo maior que os sais de cura, poderia continuar havendo um excesso na adição dos sais de cura para se utilizar menos nisina. Além disso, há controvérsias sobre o uso associado de nisina e nitrito, sendo relatado por Rayman, Malik e

Hurst (1983) que a eficácia do uso combinado para destruição de esporos de *Clostridium botulinum* só ocorreu quando o pH do meio encontrava-se abaixo de 5,8. Estes pesquisadores chegaram a esta conclusão após verificarem que a adição de 550 mg/kg de nisina (22.000 IU) e 60 mg/kg de nitrito em extrato de carne suína não foi capaz de prevenir o crescimento destes esporos em pH 5,8.

Outros estudos mostraram que a adição de *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, e *Lactobacillus plantarum*, para produção de bacteriocinas como nisina, pediocina e plantacina BN no produto, associadas à maiores concentrações de cloreto de sódio (3 a 4%) foi efetiva no controle de *Clostridium botulinum* tanto em temperaturas de refrigeração (4 e 10°C) como em temperatura abusiva de 35°C (OKEREKE; MONTVILE, 1991).

Porém esta forma indireta de utilização da nisina pode causar incerteza sobre a concentração final da mesma produzida no produto final, necessitando de cálculos precisos para determinar a concentração ideal do pool de micro-organismos necessário para exercer função antimicrobiana satisfatória em cada tipo de produto. Além disso, o processo pode se tornar inviável economicamente, além dos cuidados necessários à preservação das culturas e garantia de pureza das mesmas.

O uso direto de nisina comercial torna-se mais vantajoso para a indústria de carnes, por ser de mais fácil manipulação, economizando tempo no processamento, além de não requerer cuidados especiais em sua adição.

Não há estudos sobre a concentração de nisina requerida para uso direto sob forma de pó, associada à menores concentrações de sal, sem combinação com sais de cura, visando a inibição de *Clostridium botulinum* tipo A em patê.

A legislação brasileira preconiza o uso de nisina na concentração máxima de 12,5mg/kg (500 UI/g) em queijos processados e salsichas para inibição de *Listeria monocytogenes*, bactérias lácticas e *Brochotrix thermosphacta*. A concentração requerida para a inibição de *Clostridium botulinum* na presente pesquisa utilizando patê de frango foi de 300 mg/kg de nisina (12.000 UI/g), por tempo superior a 120 dias e na concentração de 100 mg/kg (4000 UI/g) por tempo superior a 90 dias, o que correspondeu a uma extensão da vida útil do patê em 60 e 30 dias respectivamente, quando comparada a adição de 150 mg/kg de sal de cura. Entretanto não há legislação relativa ao uso de nisina para controle de clostrídios.

Alguns países como: Rússia, Austrália, França e Peru não fixam limites de uso para a nisina em queijos processados e produtos vegetais enlatados, sendo que a Grã-Bretanha a utiliza em todos os alimentos enlatados.

De acordo com alguns pesquisadores (STILES; HASTINGS, 1991; CLEVELAND et al., 2001; DELVES-BROUGHTON, 2005) o uso da nisina em concentrações maiores que 12,5 mg/kg (500 UI/g) poderia tornar o produto inviável economicamente.

Com o objetivo de avaliar o efeito do uso da concentração requerida de nisina no patê, aliada à substituição de ingredientes tradicionais à produção por outros mais saudáveis, foi realizado o custo das formulações contendo nisina e comparado ao custo da formulação SC (considerando-se somente o custo dos ingredientes e embalagem (R\$ 1,28 cada), sem outros encargos como impostos, custos de produção, água, luz, manutenção de equipamentos, mão de obra, etc). Verificou-se que, para a formulação F1, o pote de 100g do patê custou em média R\$ 2,93, enquanto para F3 o custo foi de R\$ 3,65, para F5 o custo foi de R\$ 4,37 e SC o custo foi de R\$ 2,57. Na Tabela 22 podem ser observados os custos de cada formulação de patê de frango.

Tabela 22. Quantidades e custos para elaboração das formulações de patê de frango

Ingredientes	FC		SC		F1		F3		F5	
	Quantidade (g)	Custo (R\$)	Quantidade (g)	Custo (R\$)	Quantidade (g)	Custo (R\$)	Quantidade (g)	Custo (R\$)	Quantidade (g)	Custo (R\$)
Filezinho de frango	368,3	6,077	365,5	6,031	366,7	6,051	362,9	5,988	360,8	5,953
Iogurte com leite integral (leite integral + cultura microbiana liofilizada)	228,2	1,369	233,2	1,399	227,0	1,362	225,5	1,353	223,7	1,342
Azeite de oliva extra virgem	147,5	3,378	146,1	3,346	147,1	3,369	146,2	3,348	144,6	3,311
Água	147,5	0,146	146,1	0,144	147,1	0,145	146,2	0,145	144,6	0,143
Suco de limão	36,86	0,122	36,52	0,121	36,73	0,121	36,43	0,120	36,14	0,119
Vinho tinto seco	22,12	0,212	21,91	0,210	22,04	0,211	21,86	0,210	21,68	0,208
Sal light	11,06	0,041	10,96	0,041	11,02	0,041	10,93	0,041	10,84	0,041
Extrato de soja	7,370	0,051	7,320	0,051	7,350	0,051	7,290	0,050	7,230	0,050
Carragena	7,370	0,555	7,320	0,551	7,350	0,553	7,290	0,549	7,230	0,544
Polifosfato de sódio	7,370	0,069	7,320	0,068	7,350	0,069	7,290	0,068	7,230	0,068
Nisaplin™ (nisina tipo A)*	-	-	-	-	4,000	3,654	12,00	10,962	20,00	18,270
Alho granulado	3,690	0,278	3,660	0,276	3,670	0,276	3,640	0,274	3,610	0,272
Açúcar refinado	3,690	0,008	3,660	0,008	3,670	0,008	3,640	0,008	3,610	0,008
Farinha de linhaça dourada	3,690	0,050	3,660	0,049	3,670	0,050	3,640	0,049	3,610	0,049
Cebola em pó	2,210	0,251	2,200	0,250	2,200	0,250	2,190	0,249	2,190	0,249
Sal de cura	-	-	1,500	0,005	-	-	-	-	-	-
Corante carmim cochonilha	1,180	0,086	1,170	0,085	1,180	0,086	1,170	0,085	1,160	0,085
Antioxidante ácido ascórbico	0,730	0,066	0,730	0,066	0,730	0,066	0,730	0,066	0,720	0,065
Pimenta branca em pó (comercial, não irradiada)	0,730	0,103	0,730	0,103	0,730	0,103	0,730	0,103	0,720	0,102
Noz moscada em pó	0,430	0,049	0,430	0,049	0,420	0,047	0,420	0,047	0,420	0,047
TOTAL	1000	12,91	1000	12,85	1000	16,51	1000	23,72	1000	30,93

*Nisaplin (nisina - Danisco®) é cotado em dólar (valor atual: US\$ 450,00). O valor em reais foi baseado na cotação da data de 03/09/2012 (R\$ 2,03).

**FC – Formulação Controle: sem adição de conservadores; SC – Formulação com 150mg/kg de sal de cura; F1 – Formulação com 100mg/kg de nisina; F3 – Formulação com 300mg/kg de nisina; F5 – Formulação com 500mg/kg de nisina.

O produto comercial similar (mesma embalagem e condições de armazenamento) produzido em larga escala, com adição de sal de cura e rico em lipídios de cadeia saturada apresenta custo médio de R\$ 5,13 (pote de 130g, já considerados os encargos, custos de produção, margem de lucro, etc). Outros patês industrializados nacionais estão disponíveis comercialmente a preços ainda mais elevados. Uma marca de patê de fígado de aves tipo *Foie Gras* é vendido no supermercado Hortifrutti por R\$ 9,99/100g (embalagem plástica). Outra marca de patê de fígado de frango contendo pistache e outra também de fígado de frango com ovos podem ser encontradas no supermercado Carrefour por R\$ 19,79/200g e R\$16,50/200g, respectivamente (ambas em embalagem plástica). Todas estas formulações contêm sais de cura e ácidos graxos de cadeia saturada.

A formulação desenvolvida na presente pesquisa (F3), apresenta vida útil de 120 dias (o dobro da maioria dos produtos de mercado, já considerando uma margem de segurança de 33%). Uma produção em larga escala tende a reduzir o custo unitário do produto final. Além disso, o produto possui diferencial de mercado, com substituição de ingredientes tradicionais e aditivos químicos por outros mais saudáveis, atendendo à uma tendência de mercado.

Atualmente o custo da nisina comercial é elevado, em razão da reduzida oferta do produto no mercado. Desta forma, diversos pesquisadores (FLORES, 2000; MORAES, 2002; JOZALA, 2005; ARAUZ, 2011) têm desenvolvido metodologias para obtenção da nisina a fim de torná-la mais acessível economicamente, o que permitirá uma redução nos custos destas formulações de patê quando estes produtos estiverem sendo produzidos em escala comercial.

São necessários estudos complementares utilizando também outros produtos cárneos a fim de possibilitar a reavaliação e adequação das concentrações permitidas para cada categoria de carnes e produtos cárneos junto aos órgãos de inspeção sanitária de países que a utilizam em concentrações menores, visando a inibição específica de *Clostridium botulinum*.

Esta discussão é válida, uma vez que ainda surgem muitos casos de botulismo alimentar no Brasil e em diversos países do mundo, de acordo com dados atualizados do Ministério da Saúde (2011) e do *Centers for Diseases Control* (2012).

4.3 Resultados das Análises Sensoriais

4.3.1 Estudo do perfil dos consumidores

Com o objetivo de se conhecer os anseios dos consumidores com relação às inovações no mercado de alimentos, especificamente no tocante ao consumo de alimentos mais saudáveis, foi realizada uma pesquisa, conduzida no Laboratório de Análise de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram distribuídos questionários com perguntas simples e diretas aos 100 voluntários participantes dos testes de ordenação de preferência e intenção de compra, sendo os resultados plotados em Gráficos.

O estudo permitiu ratificar a tendência mundial atual em adquirir alimentos mais saudáveis, uma vez que estes foram preferidos por mais de 80% dos entrevistados.

Os resultados são vistos nas Figuras 31 a 38 e representam a média dos resultados dos 100 indivíduos participantes.

A representação do sexo dos entrevistados é vista na Figura 31.

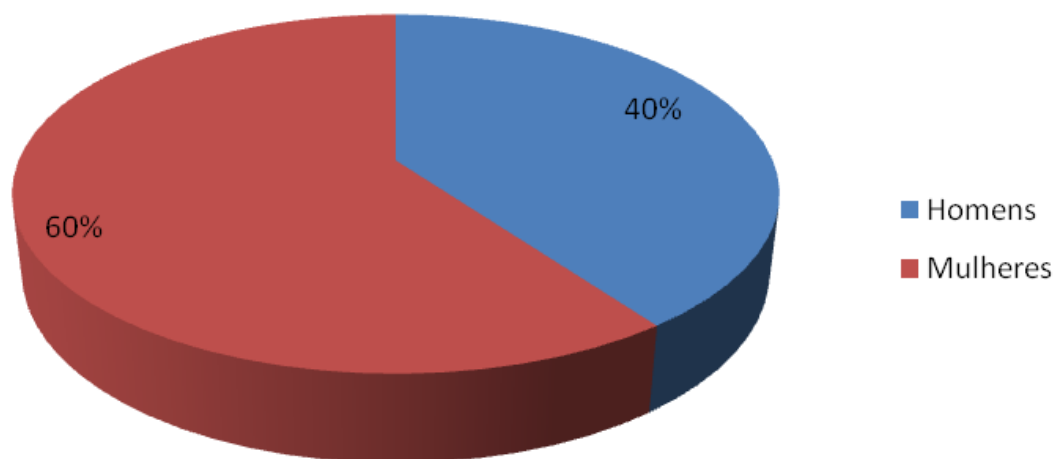


Figura 31. Sexo dos participantes

A representação da idade dos entrevistados é vista na Figura 32.

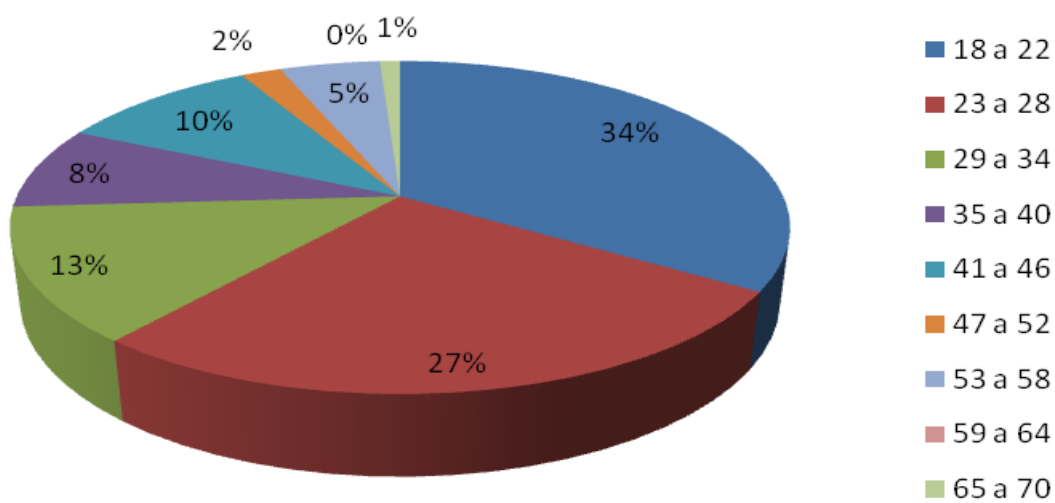


Figura 32. Idade dos participantes

A representação do grau de escolaridade dos entrevistados é vista na Figura 33.

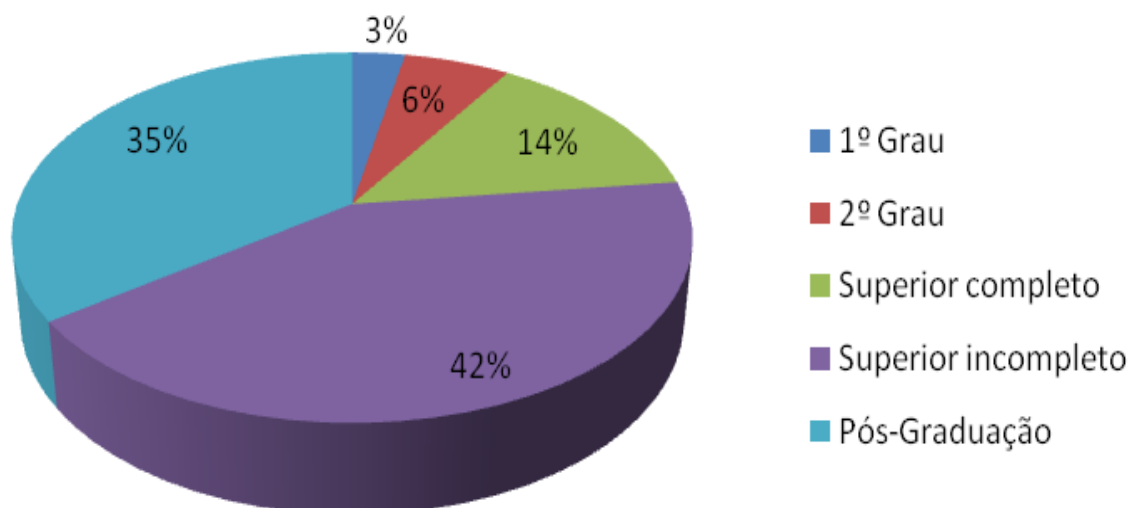


Figura 33. Grau de escolaridade dos participantes

As Figuras de 31 a 33 referem-se à caracterização dos entrevistados, sendo a maioria do sexo feminino (60%). Mais de 60% deles encontrava-se na faixa etária entre 18 e 28 anos e mais de 70% possuía grau de escolaridade entre superior incompleto e pós-graduação.

Estes resultados eram esperados, uma vez que foi realizado dentro da universidade, onde é comum a presença de jovens nesta faixa etária desenvolvendo suas atividades acadêmicas, além de docentes e discentes cursando pós-graduação.

As Figuras 34, 35, 36, 37 e 38 representam os resultados efetivos da pesquisa. A Figura 34 representa a preferência dos consumidores com relação aos aditivos utilizados nos alimentos que consomem.

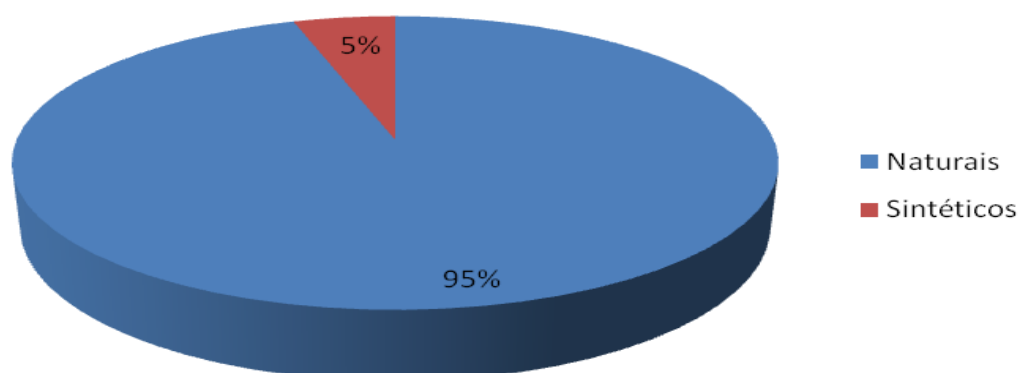


Figura 34. Tipos de aditivos preferidos

É possível verificar que a maioria dos participantes da pesquisa (95%) preferiu alimentos com aditivos naturais aos sintéticos, relatando que conheciam o fato de que estes últimos poderiam causar diversos problemas à saúde, como alergias e até mesmo alguns tipos de câncer.

Atualmente, já é de pleno conhecimento da população em geral que os aditivos sintéticos utilizados em alimentos processados, podem ser responsáveis pelo acometimento de algumas doenças alérgicas e até mesmo certos tipos de câncer. A veiculação destas informações muitas vezes chega ao consumidor por meio da mídia, ou, no caso específico do local onde foi desenvolvida a pesquisa, pelos parentes estudantes da área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, uma vez que até mesmo os participantes que possuíam menor grau de escolaridade assinalaram conhecer estas informações.

A Figura 35 representa a preferência por tipo de embalagem utilizada em produtos industrializados.

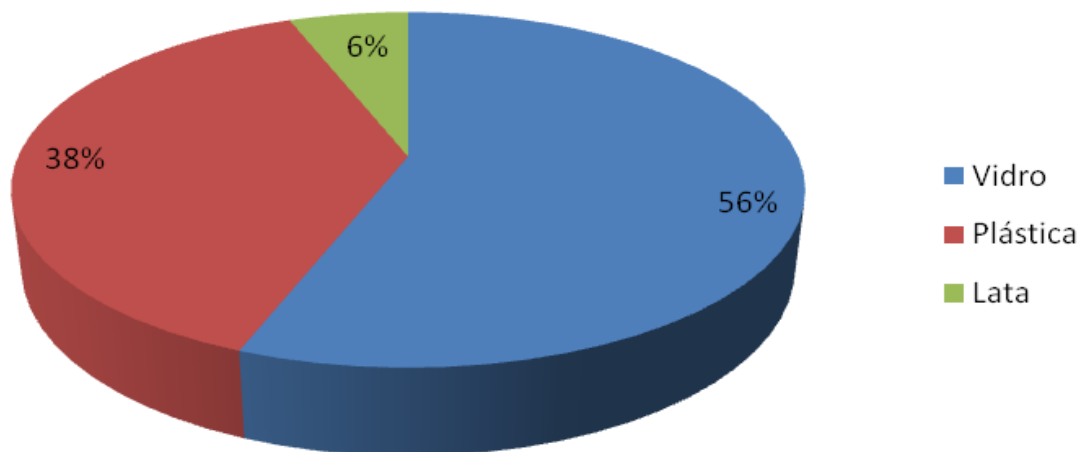


Figura 35. Preferência por tipo de embalagem

Houve maior preferência por alimentos embalados em vidro (56%), por serem de mais fácil visualização, quando comparada à embalagem metálica. Alguns participantes relataram que percebiam modificação no sabor em alimentos embalados em plástico quando comparado ao mesmo alimento em embalagem de vidro, identificando um sabor melhor neste último. A maioria dos participantes relatou ter conhecimento de que os alimentos enlatados podem ser prejudiciais à saúde pela possível migração de metais, caso a embalagem sofra danos mecânicos, além de perceberem um sabor de “cozido” e perda de textura nos alimentos embalados neste material.

A Figura 36 representa o grau de conhecimento do termo “alimento funcional”.

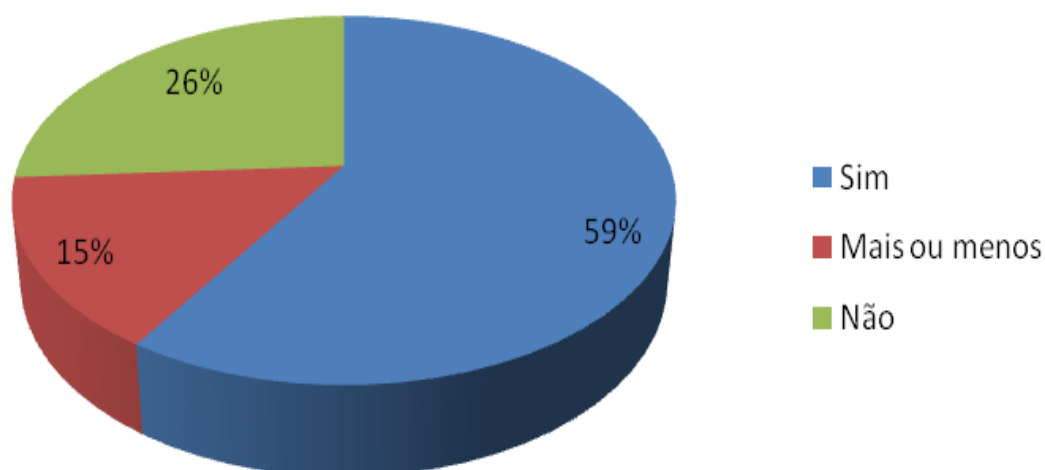


Figura 36. Conhecimento do termo “alimento funcional”

Mais de 50% dos participantes declarou conhecer o significado do termo “alimento funcional”. A explicação para este fato é semelhante à explicação encontrada para os resultados vistos na Figura 34 que trata da preferência dos consumidores por aditivos naturais em detrimento dos sintéticos.

A Figura 37 representa a regularidade do consumo de alimentos industrializados, prontos para o consumo e lanches rápidos (*fast foods*).

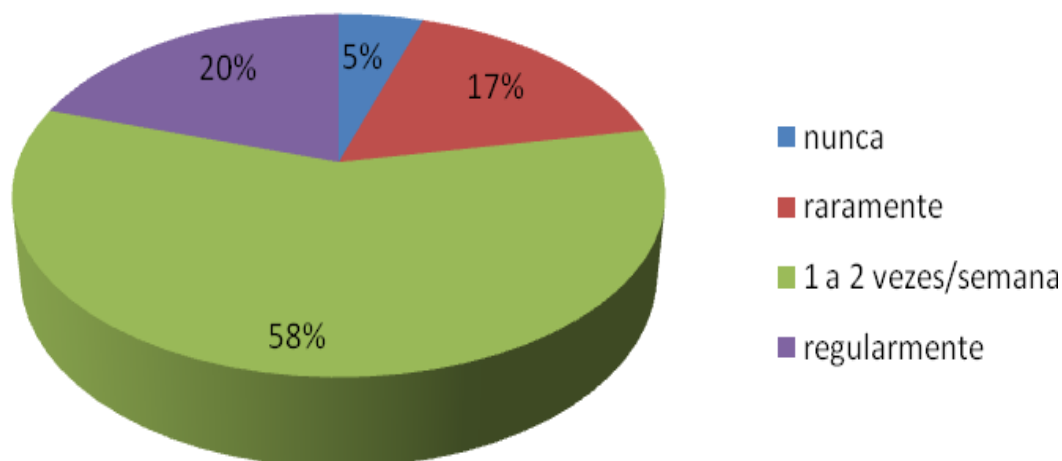


Figura 37. Substituição de refeições completas por lanches rápidos

A maioria dos entrevistados (58%) relatou substituir refeições completas por lanches rápidos, alimentos industrializados, salgados, doces ou petiscos pelo menos uma vez por semana, enquanto 17% relatou que fazia esta substituição raramente. Alguns destes participantes apontaram a falta de tempo como um dos motivos da substituição, sendo verificado que a maioria destes relatos partiu de jovens entre 18 e 28 anos.

A Figura 38 representa os resultados relacionados às doenças que acometiam os entrevistados.

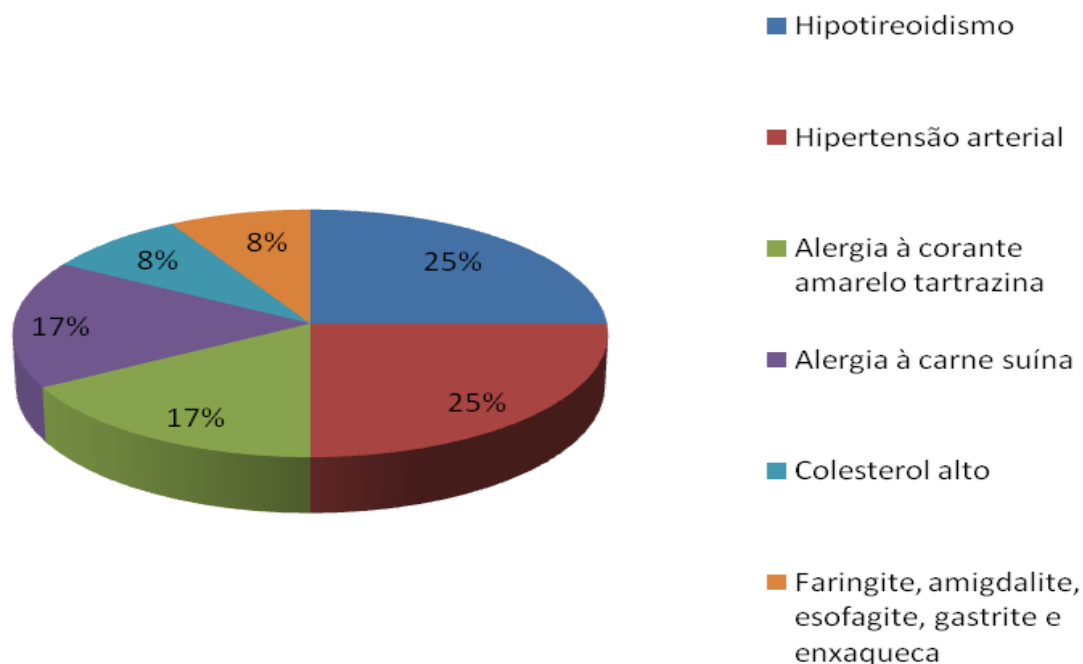


Figura 38. Doenças mais relatadas pelos participantes

Pode-se observar que houve maior destaque para o hipotireoidismo (25%) e hipertensão arterial (25%), alergia à corantes (principalmente amarelo tartrazina, com 17% do total) e carne suína (17%), além de colesterol elevado (8%), faringite, amigdalite, esofagite, gastrite e enxaqueca (8%).

O hipotireoidismo caracteriza-se em uma doença auto-imune, em que há formação de folículos linfóides devido ao aumento dos níveis de linfócitos, ocasionando lesão e destruição dos folículos tireoideanos. Com o passar do tempo, há falência tireoidiana gradual secundária, originando a destruição auto-imune destes folículos. É uma doença bastante comum, acometendo principalmente mulheres jovens (ROBERTI; SOBRINHO; DENARDIN, 2006).

Segundo Pino Rivero et al. (2004) a causa desta doença está relacionada à predisposição genética associada a fatores ambientais.

No presente estudo, todos os relatos da incidência de hipotireoidismo foram por parte de mulheres entre 41 e 58 anos.

A pesquisa mostrou que a hipertensão arterial atingiu indivíduos em ambos os sexos, principalmente em indivíduos acima de 41 anos. Muitos participantes relataram ter o hábito de consumir salgados, refrigerantes e doces entre as refeições.

As demais doenças (colesterol elevado, faringite, amigdalite, esofagite, gastrite e enxaqueca), atingiram indivíduos de ambos os sexos, em todas as faixas etárias. Estas doenças podem estar relacionadas aos maus hábitos alimentares aliado ao estresse e tabagismo.

Segundo Achutti e Azambuja (2004), o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis está fortemente relacionado à fatores genéticos, porém os fatores ambientais são seus principais desencadeadores. São responsáveis por 60% do total de óbitos em todo o mundo, havendo previsão de que atinjam 73% de óbitos em 2020. O Brasil apresenta índices ainda maiores, sendo responsáveis por 62% dos óbitos em 2001 e 39% dos casos registrados de internações em todo o Sistema Único de Saúde (SUS).

De acordo com Gottlieb, Cruz e Bodanese (2008) estas doenças estão relacionadas ao consumo de bebidas alcoólicas, fumo, sedentarismo, estresse, e ao hábito de consumo de refeições rápidas, tipo *fast foods*, em que o aporte de gorduras saturadas, carboidratos e íons sódio é bastante elevado.

Entre as principais doenças crônicas não transmissíveis estão as doenças cardiovasculares (infarto, derrame, acidente vascular cerebral (AVC) e hipertensão arterial) e as neoplasias (câncer). Estas apresentam longo período de latência, evolução prolongada, lesões irreversíveis e podem gerar complicações que promovam incapacidades variadas, comprometendo a qualidade de vida do indivíduo, culminando com sua morte (CAMPOS; NETO, 2009).

A Pesquisa de Orçamentos Familiares, realizada entre os anos de 2008 e 2009 aponta um aumento dos casos de obesidade na população acima de 20 anos, em ambos os sexos. Os resultados mostraram que os casos de obesidade em homens aumentou de 2,8% entre 1974 e 1975 para 12,4% entre 2008 e 2009. No caso das mulheres, de 8% entre 1974 e 1975, o aumento foi de 16,9% entre 2008 a 2009. Segundo o IBGE (200/2009), a explicação para este aumento no número de casos de obesidade em ambos os sexos está diretamente relacionada ao sedentarismo e a um maior consumo de alimentos calóricos.

Entre Novembro de 2006 e Janeiro de 2007, foi realizada uma pesquisa de abordagem quantitativa por Jaconodino, Amestoy e Thofehn (2007) com 50 pacientes portadores de doenças cardiovasculares agudas internados em um hospital de médio porte na cidade de Pelotas (Rio Grande do Sul). Estes pacientes eram, em sua maioria, do sexo masculino (66%) com faixa etária entre 61 e 70 anos (30%), 44% com ensino fundamental incompleto e 32% aposentados. Estes autores relataram que 44% destes pacientes estavam em condições de sobrepeso. Uma das causas pode estar associada à alimentação inadequada por um período prolongado. Em relação às alterações nos níveis de colesterol, 46% estavam com o nível desejável, inferior a 200mg/dl, porém bem próximo à este valor limítrofe e 44% apresentavam níveis de colesterol acima deste valor, entre 200-240mg/dl. Este dado relaciona-se com outro estudo realizado pelos mesmos autores, que analisou a progressão da doença arterial coronariana no sexo masculino. Os resultados também mostraram que houve associação significativa entre uma dieta rica em gordura total e saturada e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. No que se refere à hipertensão arterial sistêmica, a pesquisa mostrou que 70% dos indivíduos eram hipertensos e o infarto agudo do miocárdio foi a causa de 62% das internações.

A pesquisa realizada na comunidade acadêmica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, associada às demais pesquisas realizadas em ambientes hospitalares e em censos (IBGE) mostra que de forma geral, os brasileiros possuem o hábito de consumir alimentos hipercalóricos como: salgados, doces e refrigerantes. Estes alimentos contribuem para o aumento das taxas de obesidade e conseqüentemente favorecem o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Além disso, podem conter aditivos prejudiciais à saúde, como corantes alergênicos e conservadores potencialmente carcinogênicos. Este panorama evidencia a necessidade de se ofertar ao mercado alimentos industrializados que promovam uma melhoria na qualidade de vida, através da substituição de ingredientes nocivos à saúde por outros com comprovada funcionalidade. O uso de bioconservadores como a nisina em substituição aos tradicionais sais de nitrato e nitrito de sódio, além da substituição de ácidos graxos saturados por monoinsaturados aos derivados cárneos constitui-se em uma alternativa possível, viável e que vem ao encontro da busca do consumidor por alimentos mais saudáveis.

4.3.1 Teste de aceitabilidade em escala hedônica de 9 pontos

As médias dos resultados obtidos pelo teste em escala hedônica de 9 pontos para cada um dos atributos sensoriais das amostras teste e comerciais são vistos na Tabela 23. O índice de aceitação das amostras teste e comerciais é visto na Figura 39.

Tabela 23. Médias* das avaliações para o teste de aceitação em escala hedônica de 9 pontos

Atributos	Médias das amostras **				D.M.S***
	SC	F3	CB	CV	
Aceitação Global	7,63 ^a	7,58 ^a	7,43 ^a	5,55 ^b	0,36
Cor	7,92 ^a	7,89 ^a	4,43 ^b	4,35 ^b	0,49
Aroma	7,55 ^a	7,44 ^a	5,90 ^b	5,25 ^b	0,45
Consistência	7,13 ^b	7,05 ^b	8,18 ^a	8,18 ^a	0,32
Sabor	7,15 ^a	7,03 ^a	7,15 ^a	5,30 ^b	0,39

*Letras diferentes indicam que houve diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

** SC – Formulação teste com 150 mg/kg de sal de cura, F3 –Formulação teste com 300 mg/kg de nisina, CB – Amostra comercial em bisnaga, CV – Amostra comercial em vidro.

***D.M.S –Diferença Mínima Significativa à nível de 5%.

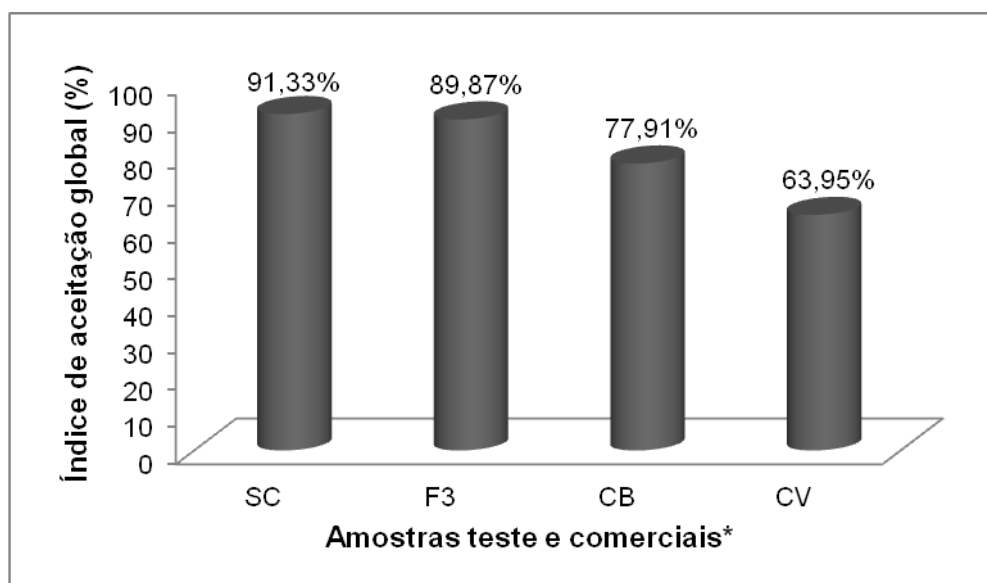


Figura 39. Aceitação global dos patês teste e comerciais (escala hedônica de 9 pontos).

*SC– Formulação teste com 150 mg/kg de sal de cura, F3 –Formulação teste com 300 mg/kg de nisina CV – Amostra comercial em vidro, CB – Amostra comercial em bisnaga.

Os resultados do teste de preferência em escala hedônica de 9 pontos mostraram que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras teste e comerciais para todos os atributos avaliados. As amostras teste SC e F3 e a comercial CB apresentaram escores médios de aceitação global de 7,63, 7,58 e 7,43 respectivamente, correspondendo ao intervalo na

escala hedônica entre “gostei moderadamente” e “gostei muito”, sem diferença significativa à 5% de probabilidade entre as amostras teste. Estes escores foram superiores aos escores médios atribuídos à amostra comercial CV com 5,55, correspondendo entre “não gostei nem desgostei” e “gostei ligeiramente”.

Com relação à cor, as amostras teste apresentaram escores médios de 7,92 e 7,89 respectivamente para SC e F3, com avaliação semelhante à que foi atribuída para a aceitação global, enquanto que às amostras comerciais foram atribuídos escores médios de 4,43 e 4,35 para as amostras CB e CV respectivamente, correspondendo à “desgostei” e “nem gostei nem desgostei” na escala hedônica. De acordo com os relatos dos provadores, as amostras comerciais apresentavam coloração parda, opaca e pouco atrativa, não se assemelhando à carne de frango. Já as formulações teste foram relatadas como mais atrativas, com mais brilho e cor mais característica de produtos elaborados à base de frango.

Quanto ao aroma, as amostras teste SC e F3 apresentaram escores médios para as amostras teste de 7,55 e 7,44, respectivamente e escores médios de 5,90 e 5,25 para as amostras CB e CV, respectivamente. Com relação à análise deste atributo, a maioria dos provadores relatou aroma mais pronunciado e agradável ao degustarem as amostras teste, em comparação ao aroma das amostras comerciais, sendo percebido nestas um “aroma de gordura”.

Entretanto, as amostras comerciais apresentaram maiores escores (8,18) para o atributo de consistência indicando afinidade entre “gostei muito” e “gostei muitíssimo”, quando comparadas às amostras teste, que apresentaram escores de 7,13 para SC e 7,05 para F3. Estes resultados podem ser explicados pelo fato das amostras comerciais terem utilizado gordura animal e matéria-prima carne que apresentava melhores características para formação de emulsão, tornando o produto mais cremoso e com melhor espalhabilidade, sendo perceptível aos provadores.

Apesar de ter havido diferença estatística entre as amostras teste e comerciais, de uma forma geral, as amostras SC, F3 e CB foram bem aceitas pelos provadores (escores médios acima de 7,00).

4.3.2 Teste de intenção de compra

As médias dos resultados obtidos pelo teste de intenção de compra são vistos nas Figuras 40 a 43.

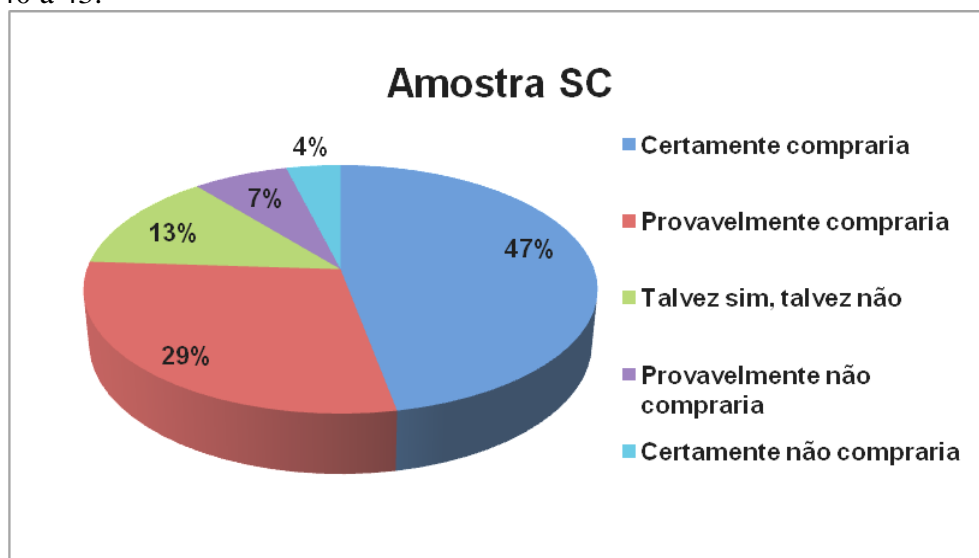


Figura 40. Intenção de compra para a amostra teste SC (com 150 mg/kg de sal de cura)

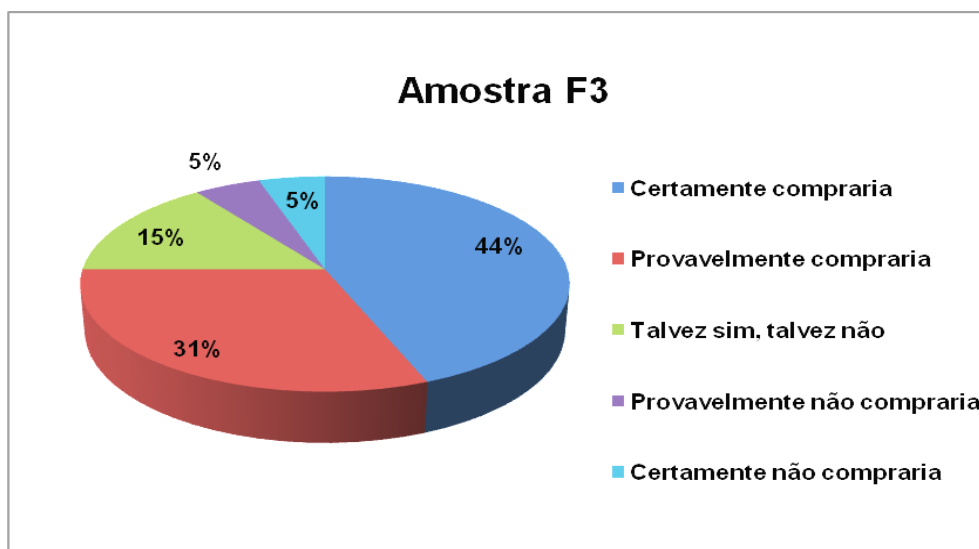


Figura 41. Intenção de compra para a amostra teste F3 (com 300 mg/kg de nisina)

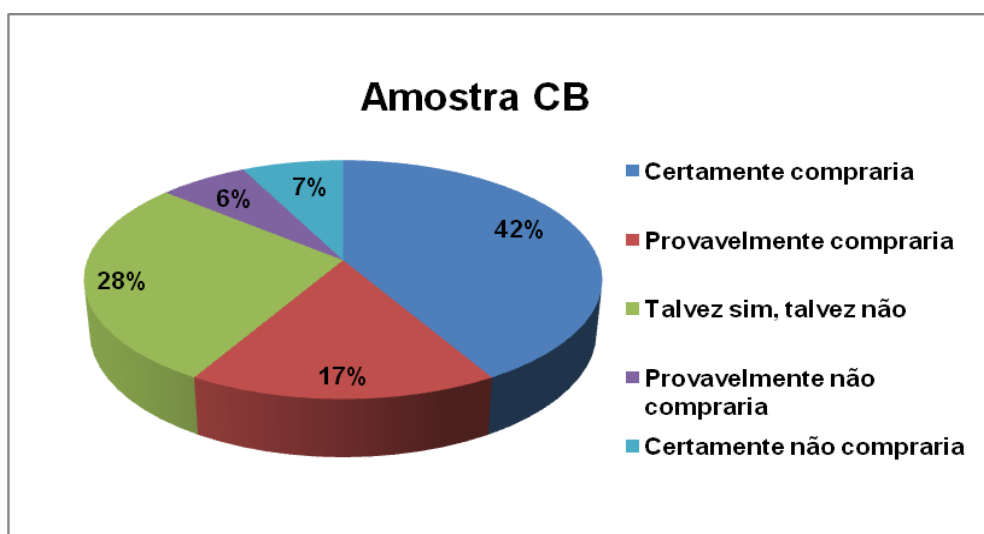


Figura 42. Intenção de compra para a amostra comercial CB (comercial bisnaga)

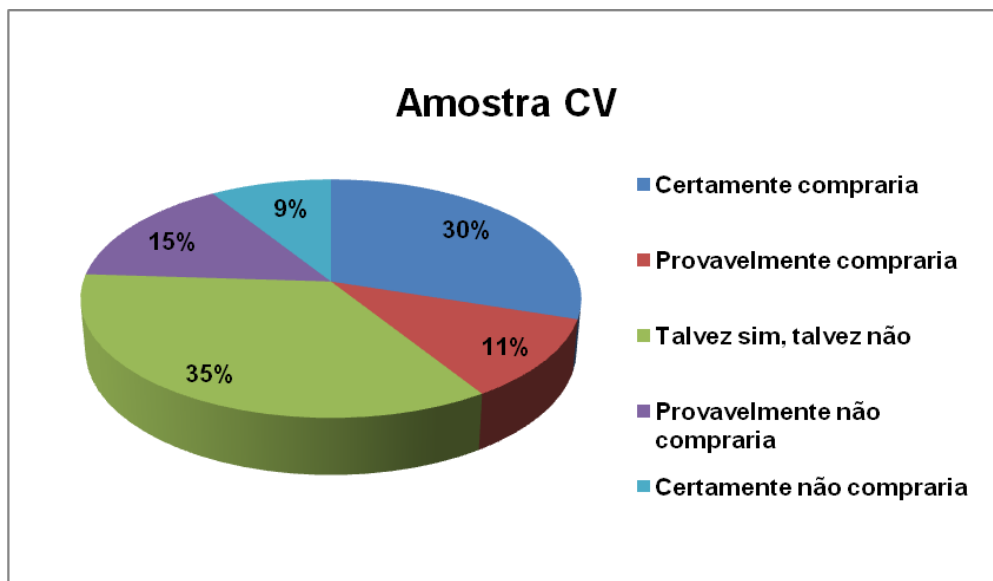


Figura 43. Intenção de compra para a amostra comercial CV (comercial vidro)

Os resultados deste teste foram semelhantes ao teste de aceitação, mostrando maior intenção de compra para as amostras teste e comercial CB quando comparadas à amostra comercial CV, sendo relatados que 47% dos provadores certamente comprariam o patê teste SC, enquanto somente 30% certamente comprariam o patê comercial CV.

Ordoñez et al. (2005) relatam que o sal de cura, além de exercer efeito conservador e proporcionar coloração rósea característica de produtos curados, também possui a habilidade de conferir sabor ao produto. Isto pode explicar a ligeira preferência relatada pelos provadores pelo patê SC quando comparado ao patê F3.

5 CONCLUSÕES

O objetivo de oferecer ao consumidor um produto seguro e mais saudável foi atingido, uma vez que as formulações teste apresentaram baixos teores de lipídios e elevado teor de proteína.

A adição de iogurte permitiu um incremento no teor de cálcio às formulações teste, porém o sal light não foi capaz de reduzir significativamente o teor de sódio, uma vez que a nisina comercial é constituída de mais de 70% de cloreto de sódio.

O perfil em ácidos graxos mostrou que houve aumento relevante na concentração de ácidos graxos monoinsaturados e redução dos ácidos graxos saturados nas formulações teste quando comparadas às amostras comerciais, mostrando que a substituição da gordura animal, geralmente presente nas formulações comerciais por azeite de oliva realmente tornou o produto mais saudável.

O teste de comparação múltipla para verificação de “*off flavour*” associado à análise de TBARS mostrou que a formulação F3 apresentou boa estabilidade à oxidação lipídica durante o período de armazenamento de 120 dias.

A nisina mostrou efeito bactericida sobre o *Clostridium botulinum* à partir de 300 mg/kg (12.000 UI/g), em condições de concentração média do teor de cloretos de 2,26% e pH entre 5,37 a 5,63, apresentando vida útil superior (maior que 120 dias) quando comparada aos produtos similares de mercado contendo sal de cura (em torno de 60 dias) mantidos sob as mesmas condições de embalagem e armazenamento.

Apesar da alta concentração de nisina requerida para estender a vida útil do produto e assegurar a qualidade microbiológica frente à presença de clostrídios, a formulação F3 pode vir a ser competitiva quando produzida em larga escala, principalmente quando houver maior oferta de nisina no mercado. Além disso, as formulações propostas apresentam diferencial de produto mais saudável, atendendo aos anseios dos consumidores. O uso da nisina na forma de pó facilita as operações de processamento na indústria, uma vez que permite sua adição direta na massa do produto, podendo também ser misturada à outros condimentos na composição de mixers.

Os testes afetivos de aceitação em escala hedônica de 9 pontos e intenção de compra mostraram que as formulações teste SC e F3 foram mais bem aceitas que as marcas comerciais CV e CB, demonstrando que teriam boa aceitação no mercado caso viessem a ser comercializadas.

Ressalta-se a importância da aplicação de programas de qualidade na indústria, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF's), Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) entre outros para assegurar a qualidade química, física e microbiológica do produto final, observando a procedência de cada um dos ingredientes adicionados às formulações, uma vez que estes podem constituir-se em importante veículo de contaminação por patógenos.

Além disso, um controle eficiente da cadeia de frio desde o processamento até à mesa do consumidor é de suma importância para garantir a eficiência do processo produtivo e a qualidade dos produtos.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- a presente pesquisa utilizou o *Challenge testing* com *Clostridium botulinum* tipo A. Seria interessante verificar também o comportamento do *Clostridium botulinum* tipo E (uma vez que são produtos mantidos sob refrigeração) e o tipo B, já que algumas linhagens são também proteolíticas, bem como o efeito da mistura destes (tipos A, B e E) frente à adição de nisina sob as mesmas condições estabelecidas nesta pesquisa. Estas futuras pesquisas poderiam ser realizadas utilizando o mesmo patê de frango, além de outros tipos de patê e demais produtos cárneos;
- o conceito de alimento funcional não é recente, porém as pesquisas com esta temática na área de tecnologia de carnes, seja pela inclusão de ingredientes funcionais na dieta dos animais de abate, seja na adição direta às formulações, estão ainda se iniciando, constituindo-se em um campo favorável para trabalhos futuros. O momento atual é bastante propício, uma vez que os consumidores estão tendo mais acesso à informações sobre a relação da alimentação saudável e a prática de exercícios físicos com a qualidade de vida e bem-estar e portanto estão buscando alimentos que ofereçam mais benefícios nutricionais;
- objetivando-se um melhor aproveitamento de subprodutos cárneos por parte das indústrias e a redução de custos da formulação, poderia-se substituir o filezinho de frango por carne desossada por trimmer.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T., KROCKEL, L., HILL, C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.28, n.2, p.169-85, 1995.

ACHUTTI, A.; AZAMBUJA, M.I.R. Doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil: repercussões do modelo de atenção à saúde sobre a seguridade social. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.9, n.4, p.833-840, 2004.

ALLEN, C.E; ALLEN, E. Some lipid characteristics and interactions in muscle foods: a review. **Food Technology**, v.35, p.253-257, 1981.

ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. Rancidity in Foods. **Applied Science Publishers**: London, U.K., 1983, p.59-66.

ALMEIDA, C. L., BOAVENTURA, G. T., GUZMAN – SILVA, M. A., A linhaca (*Linum usitatissimum*) como fonte de ácido α -linolênico na formação da bainha de mielina. **Revista de Nutrição**.v.22, n.5, set/out., p.747-754, 2009.

ANDERSON, J.; YOUNG, L.; LONG, E.; PRIOR, S. **Sodium in the diet**. Fact sheet n° 9354. Colorado State University – Extension. Revised in 2007, May. Disponível em: <<http://www.ext.colostate.edu/pubs/foodnut/09354.pdf>> Acesso em: 10 dez. 2011.

ANJO, D. F. Funcionais em angiologia e cirurgia vascular (artigo de revisão). **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n.2, p.145-154, 2004. Disponível em: <<http://www.jvascbr.com.br/04-03-02/04-03-02-145/04-03-02-145.pdf>> Acesso em 27 set.2011.

APHA – **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 2001. Edited by: Frances Pouch, 4ª edition.

AQUERRETA, Y. et al. Composition of patés elaborated with mackerel flesh (*Scomber scombrus*) and tuna liver (*Thunnus thynnus*): comparison with commercial fish patés. **Food Chemistry**, v.77, p. 147-153, 2002.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 4.ed. Viçosa: Editora UFV, 2008, p.1-62.

ARAUZ, L.J. **Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator**. 2011. 148f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

ASADUZZAMAN, S.M.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.107, n.5, p.475-487, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14141**: escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1998, 3p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. HORWITZ W. (Ed), **Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists**. 17ed. Arlington: Inc., 1988.

AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 195 p.

BACHUR, C.K et al. Suplementação dietética com resveratrol na promoção da saúde: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v.24, n.1, p.23-28, 2009.

BAILEY, S et al. Salmonella. In: JUNEJA, V.K.; SOFOS, J.N.EDS. **Pathogens and toxins in foods: Challenges and Interventions**. Washington, D.C: ASM, Press, 2010. Cap.7, p.108-118.

BARNBY-SMITH, F.M. “Bacteriocins: Applications in Food Preservation”. **Trends in Food Science & Technology**, v.3, p.133-137, 1992.

BERSET, C.; CUVELIER, M.E. **Sciences des Aliments**, v.16, p.219, 1996.

BLACKBURN, P et al. **Nisin compositions for use as enhanced, broad range bacteriocides**. AMBI, Tarrytown, New York, USA, 470929 5,753,614, 1998.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BRANDI, M.L. Natural and syntetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. **Calcified Tissue International**, New York, v.61, p.1S-8S, 1997. Supplement 1.

BRASIL. Decreto nº 55871 de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo decreto nº. 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 de abri. 1965.

BRASIL. Instrução Normativa n. 21 de 31 de Julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Patê. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 de ago.2000. ANEXO I.

BRASIL. Instrução normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p.14.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** (RIISPOA). Aprovado pelo decreto n.30.691, 29/03/52, alterados pelos decretos n.1255 de 25/06/62, 1236 de 01/09/94, 1812 de 08/02/96, 2244 de 04/06/97. Brasília, 2008. 241p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa N° 20, de 21 de julho de 1999. Métodos Analíticos Físico-Químicos, para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Sal e Salmoura. **Diário Oficial da União**, Brasília – DF, 27 de julho de 1999. Seção 1, p. 10.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**, 7.ed. - Brasília, DF, 2009, 819 p. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/botulismo>>. Acesso em 21 mar. 2012.

BRASIL. Portaria nº 1.004 de 11 de dezembro de 1998. Regulamento Técnico de Atribuição de Função de Aditivos, e seus Limites Máximos de Uso para a Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 mar. 1999.

BRASIL. Portaria nº71, de 21 de setembro de 2004. Regulamento Técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. Seção 1, p.18.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS n. 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRAY, T.M.; TAYLOR, C.G. Tissue glutathione, nutrition, and oxidative stress. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.71, n.9, p. 746-751, 1993.

BREUKINK, E et al. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. **Science**, n. 286, p.2361-2364, 1999.

BUDU-AMOAKO, E et al. Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat. **Journal Food Protection**, n.62, p.46-50, 1999.

CAI, Y.; NG, L.K.; FARBER, J.M. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp *lactis* from bean sprouts. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p. 499-507, 1997.

CAMPOS, M.O.; NETO, J.F.R. Doenças crônicas não transmissíveis: Fatores de risco e repercussão na qualidade de vida. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v.33, n.4, p.561-581, 2009.

CAO, L.T et al. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.8, p.3980-3985, 2007.

CARDOSO, T. et al. Botulismo alimentar: estudo retrospectivo de cinco casos. **ACTA Médica Portuguesa**, Lisboa, v.17, p.54-58, 2004.

CARNEIRO, J.D.S., MINIM, V.P.R. Testes de preferência. In: MINIM, V.P.R. **Análise Sensorial: Estudos com Consumidores**. Viçosa: UFV, 2006. p.51-65.

CARRÃO-PANIZZI, M.C et al. Effects of genetics and environment on isoflavone content of soybean from different regions of Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1787-1795, 1999.

CARRÃO-PANIZZI, M.C et al. Influence of growth locations on isoflavone contents in Brazilian soybean cultivars. **Breeding Science**, v. 48, p. 409-413, 1998.

CARRARA, C. L et al. Uso da semente de linhaça como nutracêutico para prevenção e tratamento da aterosclerose. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.6, n.4, p.1- 9, 2009.

CASTELLANO, P et al. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v.79, p.483-499, 2008.

CERESER, N.D et al. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.1, jan/fev. 2008.

CHENOLL, E et al. Lactic acid bacteria associated with vacuum-packaged cooked-meat product spoilage: population analysis by rDNA-based methods. **Journal of Applied Microbiology**, n.102, p.498-508, 2007.

CHOI, M.H.; PARK, Y.H. Selective control of lactobacilli in kimchi with nisin. **Letters and Applied Microbiology**, v.30, p.173–177, 2000.

CHRISTIANSEN, L.N et al. Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *Clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned comminuted cured meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 25, n.3, p.357, 1973.

CICHOSKI; A. J.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Teoria dos obstáculos (hurdle technology) em produtos cárneos curados. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116-117, p. 33-36, jan/fev. 2004.

CLEVELAND, J et al. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, n.1, p.1-20, 2001.

COLAS, J.C et al. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. **Micron**, v.38, n.8, p.841-847, 2007.

COLMENERO, F.J. Estrategías tecnológicas de optimización de componentes para el desarrollo de productos cárnicos funcionales. En: **Derivados cárnicos funcionales: estrategias y perspectivas**. Madrid. Série Informes. Madrid: Fundación Española de Nutrition – FEN, 2005, p.43-54.

ÇON, A et al. Effects of different fruits and storage periods on microbiological qualities of fruit-flavored yogurt produced in Turkey. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 4, p. 402-406, 1996.

CORDAIN, L et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century . **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 2, p. 341-354, 2005.

CORTAS, N.K.; WAKID, N.W. Pharmacokinetics aspects of inorganic nitrate ingestion in man. **Pharmacology and Toxicology**, v.68, p.192-193, 1991.

COTTER, P. D., HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nat. Review Microbiology*.,v. 3, p.777-788, 2005.

CREDIDIO, E. **Propriedades funcionais da linhaça**. 2005. Disponível em: <<http://www.nutronews.com.br/index.php/artigos-sobre-alimentos/643propriedades-nutricionais-da-linhaca.html>>. Acesso em: 22 set.2011.

CROS, M.A. Pate de salmon ahumado en lata. In: RIERA, J.B.; SALCEDO, R.C.; ALEGRET, P.L. **Química y Bioquímica de los alimentos II**. 2 ed. Universitat de Barcelona. 2004. p.27-36.

CURI R et al. **Entendendo a gordura**: os ácidos graxos.1.ed. São Paulo: Manole, 2002. Cap.11, p. 43-48.

CUTTER, C.N., SIRAGUSA, G.R. Decontamination of beef carcass tissue with nisin using a pilot scale model carcass washer. **Food Microbiology**, v.11, p.481-489, 1994.

CUTTER, C.N., SIRAGUSA, G.R. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. **Letters and Applied Microbiology**, v.27, p.19-23, 1998.

D'AOUST, J.A.Y.; MAURER, J. Salmonella species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R, eds. **Food Microbiology** : Fundamentals and Fontiers. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007.

D'ARRIGO, M et al. Production of n-3 fatty acid enriched pork liver pâté. **Food Science and Technology**, n.37, p.585-591, 2004.

DAGUER, H et al. Qualidade de produtos cárneos fabricados sob inspeção federal no Estado do Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.12, n.2, p.359-364, abr/jun. 2011.

DAHLE, L.K.; HILL, E.G.; HOLMAN, R.T. The thiobarbituric acid reaction and the autooxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.98, p.253-261, 1962.

DAVIES, E.A et al. Effective use of nisin to control lactic acid bacterial spoilage in vacuum-packed bologna-type sausage. **Journal of Food Protection**, v.62, p. 1004-1010, 1999.

DAVIES, E.A et al. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Letters and Applied Microbiology**, v.24, p.343–346, 1997.

DE ANGELIS, R. C. et al. Mezclas de arroz y frijol: valor nutricional de las proteínas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, [S.l.], v. 32, n. 1, p.47-63, 1982a.

DE ANGELIS, R. C. et al. Mezclas de arroz y frijol: valor nutricional de las proteínas. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 64-78, mar. 1982b.

DE KWAADSTENIET, M.; DOESCHATE, K.T.; DICKS, L.M.T. Nisin F in the treatment of respiratory tract infections caused by *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, n.1, p.65-70, 2009.

DE LA CRUZ, J. P., et al. — Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipidemic rats : influence of olive oil administration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1485, n.1, p.36-44, 2000.

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

DE VUYST, L. Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains. **Biotechnology Letters**, v.16, p.287-292, 1994.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**: microbiology, genetics and applications, 1994, 539 p.

DELVES-BROUGHTON, J. Nisin as a food preservative. **Food Australia**, v.57, p.525-527, 2005.

DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. **Cerela**, n.8, p.38-43, 1997.

DEVLIEGHE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. Review. **Internation Dairy Journal**, v.14, p.273-285, 2004.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: Fundamentals and frontiers**. Washington, 2001, 872p.

DRIDER, D.F.G.; HECHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, n.2, p. 564-582, 2006.

DRUZIANI, J. I.; MARCHESI, C.M.; SCAMPARINI, A. R. P. Perfil de ácidos graxos e composição centesimal de carpas (*Cyprinus carpio*) alimentadas com ração e com dejetos suínos. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p. 539-544, 2007.

DUARTE, M.T. **Avaliação do Teor de nitrito de sódio em linguiças do tipo frescal e cozida comercializadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 2010. 87p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

DUBOIS, A. Spiral bacteria in the human stomach: the gastric Helicobacter. **EID- Digestive Diseases Division**, v.1, p.79-85, 1995.

DUFOUR, M.; SIMMONDS, R.S.; BREMER, P.J. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of "natural" antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, v.85, p.249-258, 2003.

ECHARTE, M. et al. Evaluation of the nutritional aspects and cholesterol oxidation products of pork liver and fish patés. **Food Chemistry**, v.86, n. 1, p. 47-53, jun. 2004.

EDUARDO, M.B.P. **Manual das doenças transmitidas por alimentos e água: Clostridium botulinum/Botulismo**. São Paulo: Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, 2002, 41p.

EDUARDO, M.B.P.; SIKUSAWA, S. **O Botulismo no Brasil e o trabalho desenvolvido pelo centro de referência do botulismo**. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, SP- Brasil, 2002. disponível em:
<http://www.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/botu_mbpe2.pdf> Acesso em 20 mar. 2010.

ERIKSSON, C.E. Lipid Oxidation catalysts and inhibitors in raw materials and processed foods. **Food Chemistry**, v.9, p.3-9, 1982.

ESTÉVEZ, M. et al. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reaction in liver pate. *LWT – Food Science and Technology*, v. 40, p. 58-65, 2007.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry*, n.92, p.449-457, 2005.

FAGUNDES, R. L.M.; COSTA, Y.R. Uso dos alimentos funcionais na alimentação. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v.17, n.108, p. 19-23, 2003.

FANG, T.J., LIN, L.W. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork in a modified atmosphere packaging nisin combination. *Journal Food Protection*, v.57, p.479-485, 1994.

FELLOWS, P.J. **Food processing technology: principles and practice**. New York: Ellis Horwood, 1988. 505 p.

FENNEMA, O.R. **Química de alimentos**. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

FERNÁNDEZ, L.; DELGADO, S.; HERRERO, H.; MALDONADO, A.; RODRÍGUEZ, J.M. The bacteriocin nisin, na effective agent for the treatment of Staphylococcal mastitis during lactation. *Journal of Human Lactation*, v.24, n.3, p.311-316, 2008.

FERNÁNDEZ-BAÑARES, F et al. Sugar malabsorption in functional abdominal bloating: A pilot study on the long-term effect of dietary treatment. *Clinical Nutrition*, v. 25, p. 824–831, 2006.

FERNÁNDEZ-GINÉS, J et al. Meat products as functional foods: A review. *Journal of Food Science*, v.70, p.37-43, 2005.

FERRARI, C.K.B; TORRES, E.A.F.S. Alimentos funcionais: quando a boa nutrição melhora a nossa saúde. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, v. 20, n. 2, p.01-04, jul/dez. 2002.

FERREIRA MS, et al. Botulismo: considerações acerca de oito casos ocorridos no Triângulo Mineiro, Minas Gerais, Brasil. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo* v.29, p.137-141, 1987.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio de SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000.p.255-258.

FERREIRA, E.O.; CAMPOS, L.C. Salmonella. In: TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo:Atheneu, 2008.Cap. 43, p.329-338.

FERREIRA, M.A., LUND, B.M. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. **Letters and Applied Microbiology**, v.22, p.433-438, 1996.

FIELDS, F.O. Use of bacteriocins in food: regulatory considerations. **Journal of Food Protection**, Washington, v.1, p.72-77, abr.1996.

FLEMING, D.W et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal Medical**, v.312, p.404-407, 1985.

FLORES, S.H. **Estudo da produção de bioconservante nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis***. 2000. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, p. 34, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 25 maio. 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as direct human food ingredient. **Federal Register**, v. 53, p. 29-33, abr.1988.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FREAN, J. Fatal type A botulism in South África, 2002. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.98, p.290-295, 2004.

FUNASA-Fundação Nacional de Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 5. ed. FUNASA, Ministério da Saúde, Brasília, 2002.

GARCERÁ, M.J.G et al. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin role of proton motive force and lipid composition. **European Journal Biochemistry**, Berlin, n.212, p.417-422, 1993.

GARNEAU, S.; MARTIN, N. I.; VEDERAS, J. C. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 84, p. 577-592, 2002.

GERMAN, J. B; WALZEM, R. L. The health benefits of wine. **Review of Nutrition**, v. 20, p.561–593, 2000.

GOTTLIEB, M. G. V.; CRUZ, I. B. M.; BODANESE, L. C. Origem da síndrome metabólica: aspectos genéticos-evolutivos e nutricionais. **Scientia Médica**, v. 18, n. 1, p. 31-38, 2008.

GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: A review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.55, p.539-546, 1978.

GUERRA, C. C. Maturação da uva e condução da vinificação para elaboração de vinhos finos. In: REGINA, M. A. (Ed). **Viticultura e enologia: atualizando conceitos**. Caldas: EPAMIG – FECD, 2001, p. 179-192.

GUERRA, N.P.; MACÍAS, C.L.; AGRASAR, A.T.; CASTRO, L.P. Development of a bioactive packaging cellophane using Nisaplin™ as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.106-110, 2005.

GUERRERO, L. Estudos de consumidores: análise de los errores más habituales. In: ALMEIDA, T.C.A. et al. **Avanços em análise sensorial**. São Paulo: Varela, 1999. p.121-129.

GUIGA, W et al. Antimicrobial plastic film: physico-chemical characterization and nisin desorption modeling. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.203-207, 2009.

HAUSCHILD, A.H.W.; HILSHEIMER, R. Incidence of *Clostridium botulinum* in commercial bacon. **Journal of Food Protection**, v.43, p.564-565, 1980.

HERMAN, C et al. Effect of temperature, pH and NaCl on nisin activity against *Lactobacillus fructivorans*. **Journal of the Argentine Chemical Society**, v.97, n.2, p.11-18, 2009.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, p.343-362, 1995.

HU, F.B.; MANSON, J.E.; WILLET, W.C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. **Journal of the American College of Nutrition**, v.20, n.1, p.5-19, 2001.

HURST, A. Nisin. **Advances in Applied Microbiology**, v.27, p.85-123, 1981.

HURST, A.; HOOVER, D.G.; Nisin. In: DAVIDSON, P.M.; BRANEN, A.L, editors. **Antimicrobials in foods**, New York: Marcel Dekker, Inc. p.369-407, 1993.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas de qualidade de alimentos**. São Paulo: Ofsanpan, 1967. v. 5, cdu: 664.92.10, 664.92.17, 664.92.111, 664.38.

JACONODINO, C.B.; AMESTOY, S.C.; THOFEHRN, M.B. Conhecimento dos pacientes acerca dos fatores de risco relacionados à doenças cardiovasculares. **Cogitare Enfermagem**, v.12, n.4, p.466-471, out/dez, 2007.

JAKOBSEN, M.; MURREL, W.G. The effect of water activity and the aw-controlling solute on germination of bacterial spores. **Spore Resistance**, v.2, p.819-834, 1977.

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

JOHNSON, E.A.; BRADSHAW, M. *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. **Toxicon**, Oxford, v.39, p.1703-1722, 2001.

JOZALA, A.F. **Produção de nisina por Lactococcus lactis subsp. lactis ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação, como meio de cultivo**. 2005. 97p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

JUDGE, M.D.; ABERLE, E.D.; FORREST, J.C. **Principles of Meat Science**. 3 ed. Published by Kendall/Hunt Publishing Co., 1989, 351 p.

JUNQUEIRA, V.C.A. **Avaliação da incidência de *Clostridium botulinum* e da produção de toxina em mortadela e presunto**. 1994. 100f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

KAISER, A.L; MONTVILLE, T.J. Purification of the bacteriocin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scot A cells and lipid vesicles. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, p.4529-4535, 1996.

KAUR, G et al. Nisin and class II bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v.17, n.2, p.197-205, 2011.

KEET, C.A.; STROBER, J.B. Recent advances in infant botulism. **Pediatric Neuroscience**, Basel, v.32, p.149-154, 2005.

KETCHAM, E.M.; GOMEZ, H.F. Infant botulism: a diagnostic and management challenge pediatric perspective. **Air Medical Journal**, Orlando, v.22, n.5, p.6-11, 2003.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, n.1-3, p.39-85, 1993.

KOSUGI, H.; KATO, T.; KIKUGAWA, K. Formation of red pigment by a two-step 2-thiobarbituric acid reaction of alka-2,4-dienals. Potential products of lipid oxidation. **Lipids**, v.23, p.1024-1031, 1989.

KUSHI, L. H.; LENART, E. B.; WILLETT, W. C. Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge: Meat, wine, fats, and oils. **American Journal of Clinical Nutrition**. v.61 : Suppl.p. 1416S-1427S, 1995.

LAUKOVÁ, A et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM4231 in milk products. **Food Microbiology**, v.16, p.93-99, 1999.

LEIGHTON, F; URQUIAGA I. **Los componentes del vino y sus efectos beneficiosos para la salud humana**. VII CONGRESO LATINOAMERICANO DE VITICULTURA Y ENOLOGIA. Mendoza/ Argentina, 1999. Disponível em:<www.bio.puc.cl/vinsalud/publica/componentes.doc>. Acesso em: 27 setembro 2011.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Growth of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: A nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p. 4407-4413, 2001.

LOFGREN, P.A. **Meat, poultry and meat products**. Encyclopedia of Human Nutrition. 2. ed. USA: Oak Park, IL, p. 230-237, oct. 2005.

LOVE, J.D. The role of heme iron in the oxidation of lipids in red meats. **Food Technology**, v.37, p.117-129, 1983.

MACHADO, F. M. S.; SANTIAGO, V. R. Os benefícios do consumo de alimentos funcionais. In TORRES, E. A. F. S., e MACHADO, F.M. S., ed. lit. **Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns**. São Paulo: Ed. Ponto Crítico, 2001, p. 35-43.

MAQUEDA, M et al. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v. 32, n.1, p. 2-22, 2008.

MARANGONI, C.; MOURA, N.F. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Coriandrum sativum* L. em salame italiano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.31, n.1, p.124-128, jan/mar.2011.

MARIATH, A. B.; FISTAROL, C. M., NERBASS, F. B. Polifenóis e seus principais efeitos benéficos. SC - **Revista Nutrição Brasil**, v.6, n.5, p. 299-305, set/out.2007.

MARTIN, D et al. Partial replacement of pork fat by conjugated linoleic acid and/or olive oil in liver patés: Effect on physicochemical characteristics and oxidative stability. **Meat Science**, v.80, n.2, p.496-504, out.2008.

MATSUSAKI, H et al. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.36-40, 1996.

McAULIFFE, O. et al. Lacticin 3147, a broad-spectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 64, n.2, p. 439-445, feb.1998.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 1999. 387p.

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

MILLER, D.K et al. Lipid oxidation and warmed-over aroma in cooked ground pork from swine fed increasing levels of iron. **Journal of Food Science**, v.59, p.751-756, 1994.

MILLETTE, M.; SMORAGIEWICZ, W.; LACROIX, M. Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. **Journal of Food Protection**, v.67, n.6, p.1184-1189, 2004.

MININ, V.P.R. **Análise Sensorial**: estudos com consumidores. 2.ed. rev. e ampl. Viçosa, Minas Gerais: Ed. UFV, 2010. 308p.

MINOZZO, M. G; WASZCZYNSKYJ, N.; BEIRÃO, L.H. Características físico-químicas do patê de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) comparadas a produtos similares comerciais. **Revista Alimentos e Nutrição**, v.15, n.2, p.101-105, 2004.

MINOZZO, M.G. **Patê de pescado: alternativa para incremento da produção nas indústrias pesqueiras**. 2010. 228f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

MINOZZO, M.G.; MALUF, M. L. F. Indicadores da qualidade higiênico sanitárias no processamento de tilápias. In: BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A. **Industrialização de tilápias**. Toledo: GFM, 2007. p.247-269.

MORAES, D.A. **Otimização da produção de nisina em meio sintético**. 2005. 235f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

NACIF, M., et al. Dieta mediterrânea e saúde. **Cadernos de Nutrição**. v.15 n.1, p.11-24, 1998.

NASCIMENTO, M. S; MORENO, B.L.; KUAYE, P. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 11, n. 2, p. 120-127, abr/jun.2008.

NASCIMENTO, R. Substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio: influência sobre as características físico-químicas e sensoriais de salsichas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.18, n.3, p. 297-302, jul/set.2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Diet and health: implications for reducing chronic disease risk**. Washington: National Academy Press, 1989a.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Recommended dietary allowances**. 10. ed. Washington: National Academy Press, 1989b.

NEVES,S.M.C. **A história do patê**. Grupo Corrêa Neves de Comunicação, São Paulo, 2010.

NEWBURG, D.S.; CONCON, J.M. Malonaldehyde concentrations in food are affected by cooking conditions. **Journal of Food Science**, v.45, n.6, p.1681-1687, 1980.

NILSSON, L. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.769-774, 2000.

NOTERMANS, S et al. A user's guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. **Food Microbiology**, v.10, p.145-157, 1993.

O'DONNELL, H. J.; BUTLER, F. Time-dependent viscosity of stirred yogurt. Part I: coquette flow. **Journal of Food Engineering**, v. 51, p. 249-254, 2002.

OKAFOR, P. N.; OGBONNA, V. I. Nitrate and nitrite contamination of water sources and fruit juices marketed in south-eastern Nigeria. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 213-218, 2003.

OKEREKE, A.; MONTVILLE, T.J. Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. **Applied Environmental of Microbiology**, v.57, n.12, p.3423-3428, 1991.

OLIVEIRA, T.M., PIROZI, M. R., BORGES, J. T. S. Elaboração de pão de sal utilizando farinha mista de trigo e linhaça. **Revista Alimentos e Nutrição**. v.18, n.2, p. 141 – 150, abr/jun.2007.

OLIVO, M.; SHIMOKOMAKI, M. Emulsões Cárneas. In: _____ **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. Ed.Varela, 2006. Cap.12, p.123-132.

ORDÓÑEZ, J.A. et al. **Tecnología de Alimentos**. Alimentos de origem animal. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005, 294 p.

PARENTE, E.; HILL, C. Inhibition of *Listeria* in buffer, broth and milk by enterotocin 1146, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Journal of Food Protection**, v.55, p.503-508, 1992.

PAWAR, D.D.; MALIK, S.V.S.; BHILEGAONKAR, K.L.; BARBUDDHE, S.B. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. **Meat Science**, v.56, p.215-219, 2000.

PEARSON, A.M.; GRAY, J.I. Mechanism responsible for warmed-over flavor in cooked meat. In *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*, ed. G.R. Waller and M.S. Feather. **American Chemical Society Symposium Series**, v.215, Washington, D.C, p.287-300, 1983.

PENZ, R.L. **Estudo das alterações físico-químicas do azeite de oliva após tratamento térmico**. 2010. 103p. Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário UNIVATES, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2-Bacteriocins and other antimicrobial substance. **Lait**, v.72, p. 113-142, 1992.

PIMENTEL, I.C.; MAGNONI, C.D.; COSTA, R.P. Utilização do azeite de oliva na prevenção e tratamento das doenças cardiovasculares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.17, n.1, 2007.

PINILLOS, M.A. et al. **Intoxicación por alimentos, plantas y setas**. *Anales Del Sistema Sanitário de Navarra, Pamplona*, v.26, suppl.1, p.71-76, 2003.

PINO RIVERO, V et al. The incidence of thyroid carcinoma in Hashimoto's thyroiditis. Our experience and literature review. **Otorrinolaringol Ibero American**, v.31, n.3, p.223-230, 2004.

POL, I.E et al. Pulsed electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.428-430, 2000.

PRÄNDL, O et al. **Tecnología e higiene de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 854 p.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos**. 2.ed., Zaragoza: Acribia, 1994. 581 p.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R et al. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technoogy**, Amsterdam, v. 13, p. 3-11, 2002.

QUILES, J.L; RAMÍREZ-TORTOSA, C. YAQOOB, P. Chemical composition, Types and Characteristics of Olive Oil. **Olive Oil and Health**. London: CABI, 2006.

RADOSTITS, O.M. et al. **Clínica veterinária**: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.1737 p.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: **A review. Meat Science**, v.35, p.145-169, 1993.

RAJU, C.V.; SHAMASUNDAR, B.A.; UDUPA, K.S. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient (28 ± 2 °C) and refrigerated (6 ± 2 °C) temperatures. **International Journal of Food Science and Technology**, v.38, p.171-185, 2003.

RAYMAN, K.; ARIS, B.; HURST, A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. **Applied Environmental Microbiology**, v.41, p.375-380, 1981.

RAYMAN, K.; MALIK, N.; HURST, A. Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, p.1450-1452, 1983.

RESENDE, A.L.S.S. **Viabilidade técnica , qualidade nutricional e sensorial de produtos à base de carne de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 110f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

ROBERTI, A.; SOBRINHO, J.A.; DENARDIN, O.V.P. et al. Concomitância da tireoidite de hashimoto e o carcinoma diferenciado da tireóide. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.33, n.6, p.345 -349, 2006.

ROBERTS, R. F.; ZOTTOLA, E. A.; MICKAY, L. L. Use of nisin-producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. **Journal Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2353-2363, 1992.

ROBERTS, T.A.; SMART, J.L. The occurrence of Clostridia, particularly *Clostridium botulinum* in bacon and pork, p.911-915. In: J.Wolf, A. N. Barker, D.J. Ellar, G.J. Dring, and G.W.Gould (ed.), **Spores**, Academic Press, Ltd., London, v.2, 1976.

ROÇA, R. O. **Desenvolvimento de método para avaliação da absorção de água em carcaças e cortes de frangos**. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 10 p. (apostila), 2006.

ROÇA, R.O. **Cura de Carnes**. Disponível em:
<<http://puers.compuser.com/~thompson/Roca111.pdf>>. Acesso em 05 dez. 2011.

RODRIGUEZ, E et al. Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in raw Milk. **Journal Applied Microbiology**, v.83, p.389-395, 1997.

ROITMAM, E.P et al. A origem dos produtos curados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 84, p. 36-40, mar. 2008.

ROSA, F.C et al. Efeito de métodos de cocção sobre a composição química e colesterol em peito e coxa de frangos de corte. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p.707-714, jul/ago.2006.

ROSE, N.L.; PALCIC, M.M.; SPORNS, P. Nisin: a novel substrate for glutathione s-transferase isolated from fresh beef. **Journal of Food Science**, v. 67, n.6, p.2288-2293, ago.2002.

ROWLAND, L. et al. Metabolism of estrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. **Biochemical Society Transactions**, v.27, p.304-308, 1999.

RUUSUNEN, M.; POULANNE, E. **Sodium in meat products**. INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY. University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2004.

SAKAMOTO, I.; IGARASHI, M.; KIMURA, K. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. **Journal Antimicrob. Chemother**, v.47, p.709-710, 2001.

SALDANHA, T. et al. HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI, UV, and APCI-MS Detectors. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 54 n.12, p. 4107 – 4113, 2006.

SALMER, O.N.J. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n. 3, p. 1019 –1026, 2001.

SANCHES-MUNIZ, F.J. Nuevos alimentos. Realidad y perspectivas de la carne y SUS derivados como alimentos funcionales In: **Derivados cárnicos funcionales: estrategias y perspectivas**, Madrid. Série Informes. Madrid: Fundación Española de Nutrition – FEN, 2005. p.42-54.

SANDER, J.; SCHWEINSBERG, FW. Echelbeziehungen zwischen nitrat, nitrit und kanzerogenen N-nitrosoverbindungen. **Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**, v.156, p. 299-340, 1972.

SANGRONIS, E.; GARCÍA, J. **Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso “telita”**. ANALES VENEZOLANOS DE NUTRICIÓN, v.20, n.1, p.12-16, 2007.

SANTIAGO, O. **Toxi-infecciones produzidas por alimentos**. Brasília: Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal, DIPAC, Ministério da Agricultura, 1972. 276p.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. **Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal**. Biológico, São Paulo, v.64, n.2, p.123-127, 2002.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W.H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.58-64, 1996.

SCHMELZER-NAGEL, W. Patê: Novos aspectos tecnológicos. **Revista Nacional da Carne**, n.267, p.40-50, 1999.

SCHMIDT, C.F.; NANK, W.K.; LECHOWICH, R.V. Radiation Sterilization of Food. II. Some Aspects of the Growth, Sporulation and Radiation Resistance of Spores of *Clostridium botulinum* Type E. **Journal of Food Science**, v.27, n. 1, p.77-83, jan.1962.

SCHOSSLER, L.S. **Estudo da viabilidade de micro-organismo probiótico (*Bifidobacterium lactis*) aplicado em produto cárneo cozido**. 2009. 75f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocins produced by *Bacillus* spp. to conservation and food processing. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.16, n.4, p. 403-411, out/dez.2003.

SERRANO, A.M. Um provável surto de botulismo humano no Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.1, n.2, p.16-19,1982.

SERRANO, A.M.; JUNQUEIRA, V.C.A. Toxigênese de *Clostridium botulinum* em patê de frango submetido à estocagem inadequada. **Higiene Alimentar**, v.5, n.19, supl., p.25-28, 1991.

SETCHELL, K.D.R. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1333S-1346S, 1998.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão : alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, p. 7-19, 1999.

SILVA, J.G et al. Avaliação da estabilidade e da qualidade do patê de presunto, adicionado de globina bovina e de caseinato de sódio como agente emulsionante. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.1, p.10-15, jan/abr.2003.

SILVA, M. B. L., BERALDO, J. C., DEMATEI, L. R. Efeito da adição de farinha de linhaça na aceitação sensorial de bolo de chocolate. **Enciclopédia Biosfera**. v. 5, n. 8, 2009.

SILVA, M. C. D et al. Avaliação da qualidade microbiológica de pescado comercializado em Maceió, Alagoas. **Higiene Alimentar**, v.16, n. 96, p. 60-64, 2002.

SIMS, R.J.; FIORITI, J.A. CRC. **Handbook of Food Additives**, 2. ed, v.II, Ed. CRC Press. Inc.1980, p.13.

SMITH, R. Food hygiene training: the chance to create a coherent training policy. **British Food Journal**, v. 96, n. 7, p. 41-45, 1994.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍ-BELLOSO, O. Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim Milk by combining highintensity pulsed electric fields and nisin. **Journal of Food Protection**, v.69, p.345 - 353, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, São Paulo: SBC, 2001. Disponível em: <<http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2001/77Supl-III/Dislipidemia.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO. **II Consenso Brasileiro para o Tratamento da Hipertensão Arterial**: Mangaratiba (Rio das Pedras) RJ - 3 a 6 de março de 1994. Disponível em: <<http://www.sbh.org.br>>. Acesso em: 27 set. 2011.

SONDA, A. **Presunto Defumado com adição de ervas finas e fibra de colágeno**. Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Tecnologia de Alimentos – Ênfase em Carnes, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Medianeira. 2008.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, A.M. **Ocorrência de esporos de toxinas de *Clostridium botulinum* tipos C e D em cacimbas utilizadas como bebedouros de bovinos em pastagens no vale do Araguaia, Estado de Goiás, Brasil**. 2001. 164f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

SOUZA, N. **Estudo do valor nutritivo da proteína de arroz e feijão**. 1973.133f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2006.

SPREER, E. **Lactologia Industrial**. Zaragoza: Acribia, 1991, 617 p.

STEPHEN, S.A. Botulinum toxin as a biological weapon. **Journal of American Medical Association**, Chicago, v.285, n.8, p.43-49, 2001.

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

SVILAAS, A et al. Intakes of Antioxidants in Coffee, Wine, and Vegetables Are Correlated with Plasma Carotenoids in Humans. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 562 -567, 2004.

SZABO, E.A.; CAHILL, M.E. The combined affects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.43, p.21-31, 1998.

TAYLOR, S.L.; SOMERS, E.B.; KRUEGER, L.A. Antibotulinical effectiveness of nisin-nitrite combinations in culture medium and chicken frankfurter emulsions. **Journal of Food Protection**, v.48, p.234-239, 1985.

TEÓFILO, J.S.C et al. Aquecimento de vinho tinto e suco de uva utilizados em preparações culinárias não afeta a capacidade antioxidante e o teor de fenóis totais. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.24, n.1, p.153-159, jan/fev.2011.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Livraria Varela, 2004. 152 p.

TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S.; CICHOSK, A. J. Water activity, pH, moisture and growth of *Staphylococcus xylosus* during processing and storage of cured, matured and fermented pork shoulder. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 756-760, 2007.

THICHOPOULOU, A.; VASILOPOULOU, E. Mediterranean diet and longevity. **British Journal of Nutrition**. v.84, Suppl. 2, p. 205S-209S, 2000.

THOMAS, L.V et al. Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of gram-positive bacteria. **Journal Applied Microbiology**, v.85, p.1013-1022, 1998.

TONETTO, A et al. **O uso de aditivos de cor e sabor aos alimentos** (Apostila). Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2008.

TONG, Z et al. Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. **Peptides**, v.31, n.11, p.2003-2008, 2010.

TSUKAMOTO, C et al. Factors affecting isoflavones content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1184-1192, 1995.

UNITED NATIONS ADMINISTRATIVE COORDINATING COMMITTEE. Sub-Committee on Nutrition of the United Nations (ACC/SCN). Ending malnutrition by 2000: an agenda for change in the millennium: report by the commission on the nutrition challenges of the 21st century. **Food and Nutrition Bull**, [S.l.], v. 21, n. 3, p. 1-88, 2000.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. USDA. Disponível em: <<http://www.choosemyplate.gov/myplate/index.aspx>>. Acesso em 24 jul.2012.

VALENTA, C.; BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; RIGLER, H.P. The antistaphylococcal effect of nisin in a suitable vehicle: a potential therapy for atopic dermatitis in man. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.48, n.9, p.988-991, 1996.

VALLE, E.R. Carne Bovina: alimento nobre indispensável. Embrapa Gado de Corte. **Boletim Técnico**. Campo Grande, Mato Grosso do Sul, dez.2000, n. 41.

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

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 1994, 476 p.

VARNAM, A. H; SUTHERLAND, J. P. **Carne e productos cárneos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1995, 476 p.

VENTURINI, K.S.; SARCIELLI, M.F.; SILVA, L.C. Características da Carne de Frango. **Boletim Técnico – PIE-UFES:01307 – Editado em 18 ago. 2007**.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**, 2.ed. Boca Raton, Florida, EUA, 2006, 781p.

WALTER, L. D; LEDERMANND, A.N. Historia del *Clostridium botulinum*. **Revista chilena de infectología**, Santiago, v.20, p.39- 41, 2003.

WANDLING, L.R.; SHELDON, B.W.; FOEGEDING, P.M. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. **Journal of Food Protection**, v.62, p.492-498, 1999.

WESSELS, S.; JELLE, B.; NES, I. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Report of the Danish Toxicology Centre, Denmark, 1998.

WIJNKER, J.J et al. Reduction of *Clostridium sporogenes* spore outgrowth in natural sausage casings using nisin. **Food Microbiology**, v.28, n.5, p.974-979, aug.2011.

WORLD CANCER RESEARCH FUND (WCRF). **Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective**. Washington, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Geneva: WHO, 2003a. (WHO Technical Report Series, 916).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva, 1990b. (Technical report, 797).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of coronary heart disease**. Geneva, 1982. (Technical report, 678).

YUSTE, J et al. Microbiological quality of mechanically recovered poultry meat treated with high hydrostatic pressure and nisin. **Food Microbiology**, n.15, p.407-414, 1998.

ZAMFIR, M.; GROSU-TUDOR, S. Impact of stress conditions on the growth of *Lactobacillus acidophilus* IBB 801 and production of acidophilin 801. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 55, n. 4, p.277-282, 2009.

ZOTTOLA, E.A. Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, p.227-238, 1994.

ANEXOS

ANEXO A - Cadastro de Consumidores para Análise Sensorial de Alimentos

Estamos testando uma nova formulação de patê de frango, objeto de estudo de uma Tese de Doutorado, e precisamos de voluntários para darem sua opinião sobre o produto.

Pedimos por gentileza que você só preencha o formulário abaixo caso haja interesse em participar desta pesquisa. É preciso que você tenha o hábito de consumir patê pelo menos uma vez ao mês. Informamos que seus dados pessoais serão mantidos em sigilo e você poderá desistir de participar da pesquisa, caso queira.

A duração do teste será de três dias alternados, um dia para cada teste iniciando-se às 8h e finalizando às 17h, sendo estes aplicados no Laboratório de Análise Sensorial localizado no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As datas para a realização dos testes serão ainda definidas.

Desde já agradecemos sua atenção.

Nome completo: _____

Endereço completo: _____

Curso (caso seja aluno (a)): _____

período: _____

Caso não seja aluno (a), qual a sua profissão? _____

Data: _____ Telefone para contato: _____

e-mail: _____

1) Sexo:

feminino

masculino

2) Idade:

18 a 22 anos

23 a 28 anos

29 a 34 anos

35 a 40 anos

41 a 46 anos

47 a 52 anos

53 a 58 anos

59 a 64 anos

65 a 70 anos

3) Qual o seu grau de escolaridade?

primeiro grau

segundo grau

superior completo

superior incompleto

pós graduação

4) Você prefere consumir alimentos conservados por:

aditivos sintéticos (artificiais)

aditivos naturais

Por quê ?

5) Você prefere comprar os alimentos industrializados :

- em embalagem de vidro
- em embalagem plástica
- em embalagem metálica

Por quê?

6) Você conhece o conceito de “alimento funcional”?

- sim
- mais ou menos
- não

7) Com que frequência você substitui refeições completas por lanches rápidos?

- nunca substituo
- raramente substituo
- substituo de 1 a 2 vezes por semana
- (...) substituo regularmente (mais de 3 vezes por semana)

Em caso afirmativo, explique quais alimentos costuma consumir nestas ocasiões e por quê você faz esta substituição.

8) Você possui atualmente algum problema de saúde?

- sim
- não

Em caso afirmativo, especifique o problema.

9) Você estará na Universidade no próximo ano ?

() sim

() não

10) Há algum dia da semana e horário de sua preferência para a realização do teste de degustação ?

Favor especificar : _____

ANEXO B - Termo de Responsabilidade

Compreendi os objetivos do teste a que irei participar. Aceito a participação voluntária, e afirmo que as informações prestadas são verdadeiras. Autorizo os responsáveis pela condução da pesquisa, a utilizarem de minhas informações para seleção de provadores, mantendo meus dados pessoais em sigilo.

Seropédica, Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Número do documento de identidade : _____

Órgão expedidor : _____

Assinatura : _____

ANEXO C - Ficha para Teste de Comparação Múltipla para Verificação de “off flavour”

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

Sexo: ____ Grau de escolaridade: _____

TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA PARA VERIFICAÇÃO DE “off flavour”

Você está recebendo quatro amostras codificadas de PATÊ DE FRANGO. Por favor, prove a amostra identificada com P e em seguida as amostras codificadas. Compare-as com a amostra P e identifique-as como “mais preferida”, “igual preferência” ou “menos preferida”. Depois, expresse a intensidade da preferência. na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere uma da outra, em termos de SABOR. (MINIM, p.59).

Amostras

	341	137	628
Mais preferida que P	_____	_____	_____
Preferida igual P	_____	_____	_____
Menos preferida que P	_____	_____	_____
Intensidade da preferência			
Nenhuma	_____	_____	_____
Pequena	_____	_____	_____
Moderada	_____	_____	_____
Grande	_____	_____	_____
Extrema	_____	_____	_____

Obs: _____

ANEXO D - Ficha para Teste de Aceitação em Escala Hedônica de 9 Pontos

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

Sexo: ____ Grau de escolaridade: _____

TESTE DE ACEITAÇÃO EM ESCALA HEDÔNICA DE 9 PONTOS

Por favor, avalie as amostras de PATÊ DE FRANGO codificadas abaixo, atribuindo valores de 1 a 9, sendo:

- 1) desgostei muitíssimo
- 2) desgostei muito
- 3) desgostei moderadamente
- 4) desgostei
- 5) não gostei nem desgostei
- 6) gostei ligeiramente
- 7) gostei moderadamente
- 8) gostei muito
- 9) gostei muitíssimo

Amostras	Aceitação global	Cor	Aroma	Consistência	Sabor
592					
637					
428					
815					

ANEXO E – Ficha para Teste de Intenção de Compra

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

Sexo: ____ Grau de escolaridade: _____

TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA

Avalie as amostras de PATÊ DE FRANGO codificadas abaixo, atribuindo valores de 1 a 5, sendo:

- 1)certamente compraria
- 2)provavelmente compraria
- 3)talvez sim talvez não
- 4)provavelmente não compraria
- 5)certamente não compraria

amostras	Valores
592	
637	
428	
815	

OBS:
