

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

EFEITOS DE DOIS TIPOS DE EMBALAGEM A VÁCUO E DE
UM MONOGLICERÍDEO ACETILADO (DFG) NA MICROBIOTA
DETERIORADORA E PATOGÊNICA DA CARNE BOVINA
ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO

Parecer

*Este exemplar corresponde
a redação final da tese
defendida por Roseane
Batitucci Passos e aprovada
pela Comissão
Julgadora em 10.06.91*

ROSEANE BATITUCCI PASSOS

Farmacêutica-Bioquímica

Campinas, 10 de junho de 1991.

Pilar Rodriguez de Massaguer

Profa. Dra. PILAR RODRIGUEZ DE MASSAGUER

ORIENTADORA

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos para a
obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Pilar Rodriguez de Massaguer

~~Profa~~ Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer

(Orientadora)

P. E. de Felício

Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício

(Membro)

Pereira

Prof. Dr. José Luiz Pereira

(Membro)

Suplente

Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos

(Membro)

Campinas, 10 de Junho de 1991.

*"Fiz ranger as folhas de jornal
abrindo-lhes as pálpebras piscantes.
E logo, de cada fronteira distante,
subiu um cheiro de pólvora
perseguido-me até em casa.*

*Nestes últimos vinte anos
nada de novo há
no rugir das tempestades.
Não estamos alegres, é certo
mas também por quê razão haveríamos de ficar tristes?*

*O mar da história é agitado.
As ameaças e as guerras
havemos de atravessá-las,
rompê-las ao meio,
cortando-as.
Como uma quilha corta as ondas."*

MAIAKOVSKY

Aos meus pais, Walter e Márcia,
que acompanharam passo a passo
todas as etapas de minha vida,
sendo um espelho de caráter,
compreensão e grande amor.

Ao Afonso,

companheiro sempre presente.

AGRADECIMENTOS

- À profa. Dra. Pilar Rodriguez de Massaguer pela dedicação, estímulo, apoio, conselhos e pelas horas que abdicou do seu convívio familiar para orientação desta tese;
- Ao Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício pelas sugestões, apoio, confiança e realização dos contatos junto à Polyfilm;
- À Rosa Maria Tosello e Jaqueline Girnos Sonatti, pela amizade, compreensão e auxílios valiosos no laboratório, durante todas as etapas deste trabalho;
- À Polyfilm, na pessoa do Dr. Flávio Derdick, pela confiança e confecção das embalagens;
- Ao Sr. Vasco Picchi e Sr. Leonardo, pela ajuda e colaboração dedicadas na coleta de dados e amostragem feitas no frigorífico;
- Ao frigorífico Bertin, pela gentileza e atenção em ceder suas instalações e funcionários;
- Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL - por ter cedido o caminhão frigorífico para transporte das amostras;

- À Denise Marcli Bedin, pós-graduanda do Depto. de Tecnologia de Alimentos da FEA - UNICAMP;
- À Dirce Yorika Kabuki e Maria Raquel Magnani, funcionárias do Laboratório de Higiene de Alimentos do Depto. de Tecnologia da FEA - UNICAMP;
- Aos colegas de laboratório de Microbiologia de Alimentos pelo companheirismo, apoio e espírito cooperativo;
- À CAPES, pela Bolsa de Estudo concedida;
- Ao CNPq, pelo suporte financeiro;
- À Associação Brasileira de Indústria de Alimentação (ABIA) pelas cópias xerográficas;
- À todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta tese,

meu muito obrigada.

ÍNDICE

Página

índice de tabelas.....	i
índice de figuras.....	iv
Resumo.....	v
Summary.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Revisão bibliográfica.....	6
3.1 Microbiologia da carne.....	6
3.2 Embalagem a vácuo.....	16
3.2.1. Filmes plásticos utilizados.....	16
3.2.2. Sistemas de embalagem a vácuo.....	19
3.2.2.1. Sistema Cryovac.....	19
3.2.2.2. Sistema de Câmara.....	20
3.2.2.3. Sistema de embalagem em bandejas termoformadas.....	21
3.3. Características Físicas.....	22
3.3.1. Perda de Peso.....	22
3.3.2. Cor da carne fresca.....	25
3.3.2.1. Influência da embalagem a vácuo na cor da carne fresca.....	27
3.4. Aditivos comestíveis de cobertura da carne ("Edible coatings").....	31

4. Materiais e Métodos	33
4.1. Acondicionamento das porções	33
4.2. Planejamento experimental	35
4.3. Análise estatística	35
4.4. Avaliação microbiológica	36
4.4.1. Microrganismos deterioradores	37
4.4.1.1. Determinações	37
4.4.2. Microrganismos patogênicos	43
4.4.2.1. Determinações	43
4.5. Determinações físicas	50
4.5.1. Determinação de perda de peso	50
4.5.2. Determinação do pH	50
4.5.3. Avaliação do odor	51
4.5.4. Determinação da permeabilidade do filme ao oxigênio	51
4.5.5. Regeneração de cor	52
5. Resultados e Discussão	53
5.1. Determinações microbiológicas	53
5.1.1. Microrganismos deterioradores em contrafile embalado a vácuo	53
5.1.2. Identificação da microbiota psicrotró- fica	71
5.1.3. Microrganismos patogênicos em contrafilé embalado a vácuo	79
5.1.4. Identificação de Enterobactérias	94
5.1.5. Determinação de Yersinia enterocolitica	106
5.2. Determinação da perda de peso	110
5.3. Determinação do pH	114
5.4. Determinação da permeabilidade ao Oxigênio	116

5.5	Avaliação da regeneração de cor e análise de odor-----	117
6.	Conclusões-----	119
7.	Referências bibliográficas-----	122

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Classificação dos filmes de acordo com a permeabilidade ao Oxigênio.....	17
TABELA 2 - Desenho experimental utilizado.....	35
TABELA 3 - Contagens de microrganismos deterioradores em contrafilé (sem embalagem) (pH < 5,8).....	53
TABELA 4 - Contagem (log UFC/cm ²) de aeróbios mesófilos em contrafilé embalado a vácuo.....	54
TABELA 5 - Contagem (log UFC/cm ²) de anaeróbios em contrafilé embalado a vácuo.....	59
TABELA 6 - Contagem (log UFC/cm ²) de psicrotróficos em contrafilé embalado a vácuo.....	62
TABELA 7 - Contagem (log UFC/cm ²) de bactérias lácticas em contrafilé embalado a vácuo.....	65
TABELA 8 - Contagem (log UFC/cm ²) de <i>Brochothrix thermosphacta</i> em contrafilé embalado a vácuo.....	68
TABELA 9 - Distribuição da população microbiana psicrotrófica em contrafilé embalado a vácuo armazenado sob refrigeração (0 -2 °C).....	71
TABELA 10- Perfil da microbiota psicrotrófica em contrafilé imediatamente após embalagem a vácuo (zero dia de armazenamento).....	74
TABELA 11- Perfil da microbiota psicrotrófica em contrafilé após 12 dias de armazenamento.....	75
TABELA 12- Perfil da microbiota psicrotrófica em contrafilé após 24 dias de armazenamento.....	76
TABELA 13- Perfil da microbiota psicrotrófica em contrafilé após 36 dias de armazenamento.....	77
TABELA 14- Perfil da microbiota psicrotrófica em contrafilé após 52 dias de armazenamento.....	78

TABELA 15- Contagem (log UFC/cm ²) de enterobactérias em contrafilé embalado a vácuo_____	79
TABELA 16- NMP (por cm ²) de coliformes totais e fecais em contrafilé embalado a vácuo (zero dia de armazenamento)_____	83
TABELA 17- NMP (por cm ²) de coliformes totais e fecais em contrafilé embalado a vácuo (12 dias de armazenamento)_____	84
TABELA 18- NMP (por cm ²) de coliformes totais e fecais em contrafilé embalado a vácuo (24 dias de armazenamento)_____	85
TABELA 19- NMP (por cm ²) de coliformes totais e fecais em contrafilé embalado a vácuo (36 dias de armazenamento)_____	86
TABELA 20- NMP (por cm ²) de coliformes totais e fecais em contrafilé embalado a vácuo (44 dias de armazenamento)_____	87
TABELA 21- NMP (por cm ²) de coliformes totais e fecais em contrafilé embalado a vácuo (52 dias de armazenamento)_____	88
TABELA 22- NMP (por cm ²) de coliformes totais e fecais em contrafilé embalado a vácuo (60 dias de armazenamento)_____	89
TABELA 23- Contagem (log UFC/cm ²) de Staphylococcus aureus em contrafilé embalado a vácuo_____	91
TABELA 24- Distribuição da microbiota de Enterobactérias em contrafilé embalado a vácuo_____	94
TABELA 25- Perfil da microbiota de enterobactérias em em contrafilé imediatamente após embalagem a vácuo(zero dia de armazenamento)_____	99
TABELA 26- Perfil da microbiota de enterobactérias em contrafilé após 12 dias de armazenamento_____	100
TABELA 27- Perfil da microbiota de enterobactérias em contrafilé após 24 dias de armazenamento_____	101
TABELA 28- Perfil da microbiota de enterobactérias em contrafilé após 36 dias de armazenamento_____	102
TABELA 29- Perfil da microbiota de enterobactérias em contrafilé após 44 dias de armazenamento_____	103

TABELA 30-	Perfil da microbiota de enterobactérias em contrafilé após 52 dias de armazenamento_____	104
TABELA 31-	Perfil da microbiota de enterobactérias em contrafilé após 60 dias de armazenamento_____	105
TABELA 32-	Número de cepas isoladas de <i>Yersinia</i> spp em contrafilé embalado a vácuo_____	106
TABELA 33-	Espécies de <i>Yersinia</i> spp identificadas em contrafilé embalado a vácuo_____	108
TABELA 34-	Porcentagem da perda de peso em contrafilé embalado a vácuo_____	110
TABELA 35-	Média dos valores de pH em contrafilé embalado a vácuo_____	114
TABELA 36-	Permeabilidade ao Oxigênio (cc CNTP/m ² /dia/760 mmHg)_____	116
TABELA 37-	Avaliação da regeneração de cor e análise de odor em contrafilé embalado a vácuo_____	117

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Chave para a identificação de microrganismos Gram positivos.....	40
FIGURA 2 - Chave para a identificação de microrganismos Gram negativos, oxidase positivos.....	41
FIGURA 3 - Chave para a identificação de microrganismos Gram negativos, oxidase negativos.....	42
FIGURA 4 - Chave para a identificação de bastonetes Gram negativos, oxidase negativos.....	45
FIGURA 5 - Chave para a identificação de bastonetes Gram negativos, oxidase, fenilalanina e citrato negativos.....	46
FIGURA 6 - Contagem de aeróbios em contrafilé embalado a vácuo armazenado sob refrigeração.....	58
FIGURA 7 - Contagem de anaeróbios em contrafilé embalado a vácuo armazenado sob refrigeração.....	61
FIGURA 8 - Contagem de psicrotróficos em contrafilé embalado a vácuo armazenado sob refrigeração.....	64
FIGURA 9 - Contagem de bactérias lácticas em contrafilé embalado a vácuo armazenado sob refrigeração.....	67
FIGURA 10- Porcentagem relativa da microbiota psicrotrófica em contrafilé embalado a vácuo durante 5 períodos de armazenamento (zero, 12, 24, 36 e 52 dias).....	73
FIGURA 11- Contagem de enterobactérias em contrafilé embalado a vácuo.....	81
FIGURA 12- Porcentagem relativa de enterobactérias em contrafilé embalado a vácuo durante três períodos de armazenamento (zero, 12 e 24 dias).....	96
FIGURA 13- Porcentagem relativa de enterobactérias em contrafilé embalado a vácuo durante três períodos de armazenamento (36, 44 e 52 dias).....	97
FIGURA 14- Porcentagem relativa de enterobactérias em contrafilé embalado a vácuo durante 60 dias de armazenamento.....	98
FIGURA 15- Porcentagem de perda de peso em contrafilé embalado a vácuo armazenado sob refrigeração...	113

RESUMO

Com o objetivo de estudar a influência do tipo de embalagem a vácuo e da adição de monoglicerídeo acetilado - "Dermatex Food Grade"(DFG), 2% p/p, sobre a microbiota deterioradora e patogênica, foram utilizadas 84 porções de cerca de 900 g de contrafilé (*Longissimus dorsi* (pH < 5,8). As porções foram embaladas a vácuo (27 polHg) em filmes coextrusados "Barrier Bag" (Taxa de permeabilidade ao Oxigênio - $TPO_2 = 7,3 \text{ ml/m}^2/\text{dia}/1 \text{ atm}/75\% \text{ U.R.}$) e "Bag Vac" ($TPO_2 = 10,4 \text{ ml/m}^2/\text{dia}/1 \text{ atm}/75\% \text{ U.R.}$), de acordo com os seguintes tratamentos: A= "Barrier Bag"; B= "Barrier Bag" mais 2% DFG; C= "Bag Vac"; D= "Bag Vac" mais 2% DFG. As amostras foram armazenadas a 0 - 20°C, por um período de 60 dias.

As contagens microbiológicas foram realizadas mediante amostragem superficial, a cada 12 dias até o 36º dia e a cada 8 dias até o fim do experimento utilizando 25 cm² de área por amostra, sendo três amostras por tratamento/período.

Em uma primeira etapa foi quantificada a microbiota deterioradora, em cada período, incluindo aeróbios mesófilos, anaeróbios, psicrotróficos, bactérias láticas, *Brochothrix thermosphacta* e bolores e leveduras. A microbiota psicrotrófica foi isolada e identificada. Paralelamente foram avaliados perda de peso, pH, regeneração de cor e odor.

Em uma segunda etapa (utilizando os mesmos número e acondicionamento das porções indicados acima), a microbiota patogênica foi quantificada (*Enterobactérias*, *Clostridium perfringens*, *Coli-*

formas totais e fecais *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*). *Salmonella*, foi pesquisada em 25 g de amostra.

O contrafilé apresentou uma carga microbiana inicial baixa, de 2,53 (log UFC/cm²), de bactérias aneróbias mesófilas.

Não se detectou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, por período, nas médias de contagens da microbiota deterioradora. Os aeróbios mesófilos, psicrotróficos e bactérias lácticas apresentaram um "lag" inicial em torno de 12 dias. Entre 12 e 24 dias foi observado o maior aumento da população, sendo que a partir desse período houve uma tendência à estabilização. A máxima contagem observada foi de 6,92 (log UFC/cm²) para bactérias lácticas no 52º dia de estocagem.

Entre 0 e 24 dias de armazenamento a contagem de *Brochothrix thermosphacta* aumentou com subsequente decréscimo durante a estocagem. Este decréscimo coincide com o aumento de bactérias lácticas. A população de bolores e leveduras não sofreu alteração durante o experimento.

As *Pseudomonas* (33,3%) foram dominantes entre a microbiota psicrotrófica, no início da estocagem. Após 12 dias os *Lactobacillus* se tornaram dominantes (58,3%), aumentando para 100 % aos 24 dias de estocagem.

Houve ausência de *Salmonella* em todas as amostras e as contagens de *Clostridium perfringens* observadas durante a estocagem não foram expressivas. *S. aureus* aumentou de 0,7 log UFC/cm² inicialmente até 1,76 log UFC/cm² aos 24 dias, porém após este período este não foi detectado.

SUMMARY

With the aim to study the influence of the type of vacuum package and the addition of 2% (w/w) acetylated monoglyceride ("Dermatex Food Grade" DFG), 84 striploin cuts (*Longissimus dorsi* (pH < 5.8) of average weight of 900 g were used. These cuts were vacuum packaged (27 in Hg) in commercially coextruded films "Barrier Bag" (Oxygen Transmission Rate-OTR= 7.3 mL/m²/day/1atm, 75% RH) and "Bag Vac" (OTR=10.4 mL/m²/day/1atm, 75% RH). Treatments were as follow: A: "Barrier Bag"; B: "Barrier Bag" plus 2% DFG; C: "Bag Vac"; D: "Bag Vac" plus 2% DFG. Samples were refrigerated (0 - 20°C) and stored for 60 days.

Surface sampling for the counts was performed every 12 days until the 36th day and every 8 days thereafter, using a 25 cm² area per sample, 3 samples per treatment/period.

In the first trial, the spoilage flora was quantified for each period including aerobic mesophilic, anaerobic, psychrotrophic, *Brochothrix thermosphacta* and yeasts and molds. Psychrotrophic flora was isolated and identified. Weight losses, pH, color regeneration and odor were also determined.

In the second trial (using the same number of samples and conditioning as stated before), the pathogenic flora was quantified (*Clostridium perfringens*, total and fecal coliforms *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica*). The analysis of *Salmonella* was carried out in portions of 25 g.

The raw muscle has an initial load of approximately 2,53 log CFU/cm² of aerobic mesophilic. No difference ($p > 0.05$) was detected among treatments by period, on the mean counts of spoilage bacteria. Aerobic mesophilic, psicrophrophic and lactic bacteria showed an inical lag of about 12 days. Between 12 and 24 days, the greatest population increse was observed for these organisms. After this period the population showed a tendency to stabilize. The highest count obtained was 6.92 log CFU/cm², for lactic bacteria on the 52nd. day of storage.

Between zero and 24 days *B. thermosphacta* increased , with subsequent decrease with storage, which was coincident to the raise of the lactic populations. The population of yeast and mold did not alter during the experiment.

Pseudomonas ((33.3%)) were dominant among the psicrothrophic microflora at the beggining of storage. After twelve days *Lactobacillus* became dominant (58.3%) ,rising to 100% on the 24th. day.

Salmonella was absent in all samples and *C. perfringens* counts were not expressive during storage. *S. aureus* increased from 0,7 log CFU/cm² to 1,76 log CFU/cm² on the 24th. day, but it was not detected after this period .

Among the isolated *Enterobacteriaceae*, *Serratia* spp was dominant in all periods, except on the 12th. day, when *Enterobacter* spp was dominant.

In all periods and treatments *Y. enterocolitica* was not detected, but *Y. kristensenii* and *Y. intermedia* were identified.

Weight losses increased with the storage time. No difference ($p > 0.05$) was observed among treatments, however numerical values of weight losses were lower in those treatments using DFG.

A slight pH decrease was observed during all storage time, and it was markedly lower between 12 and 24 days of storage.

No difference ($p > 0.05$) was observed on the average values for color bloom, among treatments within storage period.

After 44 days of storage off odors were detected (butiric and acetic odours), which limited shelf life.

1. INTRODUÇÃO

A carne fresca é considerada muito perecível por ser um meio rico em elementos nutritivos necessários para o crescimento microbiano. Durante o processo de abate é quase inevitável a presença de contaminantes provenientes principalmente do couro e vísceras, que podem atingir a carcaça. (NEWTON et alli, 1978) Entre o abate e a comercialização, a carne é armazenada em temperaturas de refrigeração por um período, para que ocorram transformações físico-químicas "post-mortem" no músculo, originando o aparecimento de características organolépticas desejáveis, principalmente maciez. (ASGHAR & YEATES, 1978)

Há dois tipos de alteração que podem ocorrer durante o armazenamento de carnes refrigeradas:

- alteração da cor devido à transformação da mioglobina em contato com o ar;
- alteração de origem microbiana, que leva à putrefação eventualmente associada a uma multiplicação de microrganismos patogênicos (ROSSET, 1978).

A manipulação da carne durante a desossa e a posterior embalagem dos cortes podem aumentar a contaminação, afetando a qualidade final do produto, principalmente daqueles estocados por algumas semanas em embalagens plásticas sob refrigeração.

Este período de tempo não provoca uma degradação da carne, desde que se observe algumas normas de higiene (para se obter

uma contagem inicial baixa), conjuntamente a utilização de embalagens adequadas e armazenamento a baixas temperaturas (-1 a 3°C) (ROSSET, 1978).

Sendo um alimento altamente perecível, o aumento da vida de prateleira tem sido o objetivo primordial e uma das maiores preocupações da indústria de carnes.

A escolha do material de embalagem irá influir na manutenção da umidade, em nível desejável, e na disponibilidade de oxigênio, a fim de retardar as reações microbianas e enzimáticas. Assim, a embalagem se torna um fator preponderante em relação à vida de prateleira da carne refrigerada. (RIZVI, 1981)

Basicamente são utilizados três tipos de embalagens para carne refrigerada acondicionada em filmes flexíveis:

1. Embalagens com filmes impermeáveis ao vapor de água e permeáveis a gases (O_2 e CO_2). A atmosfera interna possui uma composição muito próxima à da atmosfera ambiental;
2. Embalagens com filmes totalmente impermeáveis (gases e vapor de água). O acondicionamento pode ser feito sob pressão atmosférica normal ou sob pressão reduzida (embalagem a vácuo). A composição da atmosfera se modifica durante a estocagem; há diminuição de O_2 e aumento de CO_2 , devido à respiração celular e microbiana. Este sistema cria um ambiente anaeróbico/microaerófilo;
3. Embalagens com filmes totalmente impermeáveis e injeção de uma mistura gasosa. O_2 e CO_2 essencialmente de composição conhecida (embalagem com atmosfera modificada) (ROSSET, 1978)

Dentre os vários tipos de acondicionamento para cortes de carne refrigerada, a embalagem a vácuo tem sido amplamente utilizada no comércio de carnes quando o objetivo é estender a vida de prateleira por uma ou mais semanas.

A vida de prateleira da carne refrigerada, em embalagens permeáveis a gases, é de 2 a 4 dias (DAUN & GILBERT, 1979), enquanto que a utilização de embalagem a vácuo, pode prolongar a vida de prateleira por até 8 semanas. (ROSSET, 1978). Além desta vantagem, há a redução da perda de peso, devido à prevenção da evaporação e perda por recortes; a preservação da cor da carne (mioglobina reduzida devido à eliminação de oxigênio); a promoção de um ambiente ideal para a maturação da carne, e a melhoria no controle higiênico (BREIDENSTEIN, 1982).

Existem alguns compostos que, aliados à tecnologia de embalagem a vácuo, podem contribuir para a diminuição da perda de peso por exudação da carne e da carga microbiana contaminante, com consequente aumento da vida de prateleira da carne fresca. Entre eles, são citados os monoglicerídeos acetilados. (LIEBICH et alli, 1986).

Até o momento não existem, no Brasil, pesquisas a respeito do efeito da embalagem a vácuo da carne bovina, associada a aditivos em relação ao desenvolvimento da microbiota deterioradora e patogênica, durante um período de armazenamento sob refrigeração.

Levando-se em consideração a importância da comercialização deste produto no mercado interno e externo, faz-se necessário realizar um estudo mais aprofundado do tema, com o enfoque na quantificação e identificação desta microbiota, a fim de se comparar o desempenho de dois tipos de embalagem a vácuo e utilização de monoglicerídeo acetilado, nas condições nacionais de processamento.

2. OBJETIVOS

Estudar o efeito das embalagens a vácuo "BARRIER BAG" e "BAG VAC" conjuntamente ao uso de monoglicerídeo acetilado (DERMATEX FOOD GRADE , DFG) sobre a microbiota deterioradora e patogênica e também sobre algumas alterações físico-químicas do contrafilé (músculo Longissimus dorsi) armazenado sob refrigeração (0 a 20C), por um período de zero a sessenta dias.

3 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.MICROBIOLOGIA DA CARNE

A população microbiana da carne fresca é uma mistura diversa de microrganismos mesófilos e psicrotróficos. Estes são provenientes do couro e das vísceras do animal, sendo os principais contribuintes para a contaminação da carne durante as etapas do abate. Após o abate a carga microbiana pode estar entre 10^2 e 10^4 UFC/cm² (TAYLOR, 1985). Esta microbiota é constituída principalmente de microrganismos deterioradores e patogênicos. Durante o processo de abate há um aumento no número dos microrganismos psicrotróficos (NEWTON et alii, 1978). Estes se multiplicam a baixas temperaturas e são responsáveis pela deterioração da carne refrigerada em condições aeróbias. Entre eles estão predominantemente os gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes* e *Achromobacter* (PARISI & GIACOMI, 1983; ROSSET, 1978) e corineiformes produtores de tióis (PARISI & GIACOMI, 1983).

Segundo BROWNLIE (1966); CANTONI et alii (1983) e PIERSON et alii (1970) as *Pseudomonas*, por apresentarem a característica de crescimento rápido, tornam-se predominantes dentre a população deterioradora da carne refrigerada em condições aeróbias.

Estes microrganismos deterioram a carne em 10 dias a 0°C ou 5 dias a 5°C (TAYLOR, 1985). Quando a contagem de *Pseudomonas* atinge 10^6 UFC/cm², a carne apresenta odores putrefativos, resultante do ataque aos aminoácidos presentes (NEWTON & RIGG, 1979).

Este ataque começa quando a glicose na carne não é mais suficiente para as necessidades da microbiota (GILL, 1983).

Os processos pelos quais a carne desenvolve qualidades inaceitáveis para os consumidores estão relacionados com fatores intrínsecos e extrínsecos, ligados às suas próprias características, à microbiota deterioradora e temperatura de armazenamento. Estes fatores influenciam decisivamente a vida de prateleira. (DELAZARI 1981). Assim, sob condições normais de estocagem e refrigeração, a superfície da carne exposta ao ar possibilita o aumento da deterioração microbiana, afetando sua vida de prateleira (CHRISTOPHER et alii, 1980). Outro fator que influencia na vida de prateleira da carne é a carga microbiana inicial.

O efeito do oxigênio do ar sobre as alterações microbiológicas e modificações químicas da carne refrigerada tem sido intensamente estudado (CHRISTOPHER et alii, 1980; GRAU, 1978; HANNA, 1976; JAYE et alii, 1962; LEE et alii, 1981; PIERSON et alii, 1970; SHERIDAN & SHERINGTON, 1982; SIMMARD et alii, 1985; TAYLOR, 1985).

O acondicionamento a vácuo ou sob atmosfera modificada não só reduz a proliferação da microbiota, mas também promove uma seleção de microrganismos presentes, devido à redução do teor de oxigênio no interior da embalagem, pelo consumo de O_2 através da respiração tecidual e produção de CO_2 , que se acumula no interior da embalagem. (ROTH & CLARK, 1972). Cria-se, assim, condições anaeróbias que suprimem o crescimento de bactérias deterioradoras e seleciona o crescimento de bactérias lácticas (ROSSET, 1978; PIERSON et alii, 1970).

De acordo com DIXON & KELL (1989) e DANIELS(1985), um dos efeitos do CO₂ é prolongar fase de adaptação ("lag") e aumentar o tempo de geração dos microrganismos deterioradores. Além disso, as espécies Gram positivas são mais resistentes que as Gram negativas aos efeitos do CO₂ (DIXON & KELL, 1989). As hipóteses deste efeito são de que o CO₂ se solubilize na fase líquida do tecido, (HOTCHKISS, 1988) na forma de ácido carbônico (H₂CO₃) inibindo a atividade microbiana (FINNE, 1982) ou que o CO₂ promova, na célula, efeitos negativos na fisiologia dos microrganismos (TAN & GILL, 1982). GOLDWIN (1945) apud DANIELS (1985) afirmou que o aumento de inibição de crescimento de microrganismos a baixas temperaturas estava correlacionado com o aumento da solubilidade do gás carbônico na fase líquida. ROTH & CLARK (1972) sugeriram que o CO₂ pode ter um efeito controlador, inibindo de uma maneira drástica o crescimento de acromobactérias e Pseudomonas, não possuindo efeito no crescimento de lactobacilos.

Ao contrário da embalagem com filmes permeáveis a gases, a carne embalada a vácuo pode apresentar uma contagem total de microrganismos na ordem de 10⁷ UFC/cm², após 5 semanas a 10°C, sem que se observem sinais de alteração, como o aparecimento de odores pútridos (GILL & NEWTON, 1980; NEWTON & RIGG, 1979; ROSSET, 1978).

A predominância de bactérias lácticas foi observada em carne embalada a vácuo, após 8 dias de estocagem sob refrigeração (JAYE et alli, 1962; PIERSON et alli, 1970; SEIDMAN et alli, 1976).

ORDAL (1962) apud (SEIDMAN & DURLAND, 1983) demonstrou que as bactérias lácticas representam uma pequena porção da contagem inicial e que, após 6 a 8 dias de armazenamento, apresentam-se como 50% da população microbiana da carne refrigerada embalada a vácuo

SEIDMAN et alii (1976c) estudando carne bovina embalada a vácuo armazenada sob refrigeração (1 a 3°C), durante 35 dias, encontraram um aumento pronunciado na contagem total de aeróbios no período compreendido entre 14 e 21 dias de estocagem , comparado aos outros dias. Após 28 dias de estocagem a população bacteriana psicotrófica consistia em sua maioria de *Lactobacillus* (numa faixa de 85,7 a 99,4% da contagem total), enquanto que *Pseudomonas* (0 a 8,6%) e *Enterobacteriaceae* (0 a 12%) representavam apenas uma pequena porcentagem dessa microbiota. ZAMORA & ZARITSKI, (1985) trabalhando com carne bovina embalada a vácuo armazenada a 0°C encontraram uma porcentagem de *Lactobacillus* spp de 91,1% , quando a contagem total atingiu 10^7 UFC/cm².

Vários microrganismos foram identificados em contrafilé embalado a vácuo após 35 dias de estocagem sob refrigeração. Entre 0 e 7 dias houve a predominância de *Moraxella-Acinetobacter* e *Corynebacterium*; entre 21 e 28 dias houve o predomínio completo de *Lactobacillus*. Encontraram-se algumas *Enterobacteriaceae* que, no entanto, representavam uma pequena proporção da população total. As espécies de enterobactérias presentes foram *Enterobacter liquefaciens*, *E. herbicola*, *E. aerogenes*, *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica* (SEIDMAN et alii, 1976c).

De acordo com GRAU (1978), há diferenças na população de microrganismos Gram negativos, durante o período de estocagem da carne fresca embalada a vácuo. Nas primeiras 4 semanas, os microrganismos são do tipo oxidativo: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*. Nas 7 semanas seguintes, quase a metade dos microrganismos são Enterobacteriaceae fermentativas e, no final da estocagem (17 semanas), a maioria é Enterobacteriaceae, principalmente *Enterobacter*.

KENNEDY Jr. et alii (1982) identificaram as seguintes espécies predominantes, entre as Enterobacteriaceae, em carne fresca embalada à vácuo: *Erwinia herbicola*, *Citrobacter* sp e *Yersinia enterocolitica*, num período de estocagem de 14 a 21 dias, sob refrigeração (0 a 10°C).

Em relação a enterobactérias, alguns pesquisadores observaram que, a presença dessas ocorre em número significativamente maior em carne maturada em embalagem a vácuo do que em carne maturada convencionalmente (NEWSOME et alii, 1984). Essas bactérias, além de causarem deterioração, podem provocar danos à saúde, uma vez que algumas espécies são patogênicas (HANNA et alii 1976). SEIDMAN & DURLAND, (1983) concluíram que abuso de temperatura da carne embalada a vácuo é um fator importante que deve ser controlado, uma vez que as condições anaeróbias criadas pela embalagem, combinadas ao o abuso de temperatura, podem promover um ambiente favorável ao crescimento de bactérias patogênicas.

HANNA et alii (1976); SEELYE & YEARBURY (1976) isolaram *Yersinia enterocolitica* de carne embalada a vácuo, armazenada

sob refrigeração e a detecção desta foi verificada após 4 dias de armazenamento. *Y. enterocolitica* é um bastonete Gram negativo anaeróbio facultativo. Encontra-se no ambiente e, do ponto de vista de saúde pública, uma de suas características mais importantes é a capacidade de crescimento sob baixas temperaturas. Este microrganismo pode causar gastroenterite, linfadenite e ileíte (VANDERZANT et alii, 1980; SWANINATHAN et alii, 1982). Segundo SEELEY & YEARBURY (1979), o pH maior que 6 favorece o crescimento de *Y. enterocolitica*.

HOLLAND (1977) apud (SEIDMAN & DURLAND, 1983) relatou que, apesar de algumas bactérias potencialmente toxigênicas como *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens* não apresentarem problema devido à sua inibição de crescimento sob temperaturas de refrigeração, estes dois microrganismos podem sobreviver por até 6 semanas a 0-2°C, em carne embalada a vácuo.

SEIDMAN et alii (1976a) estudaram dois sistemas de embalagem de carne refrigerada, armazenada por 35 dias. Trabalharam com três níveis de vácuo, que forneciam 25,8 polHg (alto vácuo), 16,6 polHg (vácuo intermediário) e 11,2 polHg (baixo vácuo). Observaram que a contagem total de anaeróbios no período entre 0 e 35 dias de estocagem sob refrigeração (1 a 3°C), não apresentou diferença significativa entre os vários níveis de vácuo, porém a contagem entre 21 e 35 dias apresentou uma tendência a ser menor nos cortes embalados sob alto vácuo do que nos de vácuos baixo e intermediário. E sugeriram que as baixas contagens microbianas encontradas nos períodos entre 7 e 14 dias de armazenamento poderiam ser devidas ao processo de imersão das embalagens em

água quente, fato que poderia destruir e/ou causar injúrias subletais aos microrganismos da superfície da carne embalada a vácuo

Além de bactérias láticas, alguns trabalhos citam a presença de enterobactérias psicotróficas (GRAU, 1978; KENNEDY Jr et alli, 1982; SEIDMAN et alli, 1976) e *Brochothrix thermosphacta* (CANTONI et alli, 1983; CANTONI et alli, 1989; GARDNER, 1966; GRAU, 1978; PIERSON et alli, 1970; TAYLOR, 1985) em carne refrigerada embalada a vácuo. Este último microrganismo se apresenta como um cocobacilo Gram positivo, imóvel, não esporulado, psicotrófico, anaeróbio facultativo, catalase positivo, com metabolismo fermentativo, apresentando pleomorfismo em culturas puras de agar nutriente. Possui também baixa resistência térmica ($D_{50}=2,5$ min) (DAVIDSON, 1968). Seu habitat natural é a água, mas se adapta secundariamente ao couro, tornando-se um contaminante em potencial da carcaca. (SWANSON, 1982).

ROTH & CLARK (1975) demonstraram que a presença de lactobacilos inibia o crescimento de *B. thermosphacta* em carne embalada a vácuo armazenada sob refrigeração, sugerindo que esta inibição poderia ser causada por uma substância produzida pelos *Lactobacillus* e não por competição por espaço ou nutrientes. De acordo com DAESCHEL (1989) as bactérias ácido láticas são capazes de produzir substâncias inibidoras, além do ácido acético e lático, tais como peróxido de hidrogênio, diacetil, bacterocinas e hipotiocianato, que são antagonistas de microrganismos. NEWTON & GILL (1978) afirmaram que o crescimento de *Lactobacillus* não é inibido por altas contagens de outras espécies, talvez devido a baixa

afinidade de *Lactobacillus* pela glicose pois *Lactobacillus* atacam a arginina, que não é utilizada por outras espécies. Com isso há o favorecimento do crescimento deste microorganismo em altas densidades, similares às aquelas conseguidas sem espécies competidoras, assegurando o domínio de *Lactobacillus* na carne armazenada anaerobicamente sob refrigeração. NEWTON & RIGG (1979) verificaram que, com o aumento da permeabilidade do filme, *B. thermosphacta* passa a oxidar o glutamato, se tornando um competidor com os *Lactobacillus*.

Dentre as modificações de odor que podem ocorrer, na carne embalada a vácuo uma leva ao aparecimento de odor a queijo, que é devido à flora Gram positiva fermentativa (CANTONI et alii, 1989; GRAU, 1978). NEWTON & RIGG (1979) demonstraram que *B. thermosphacta* é o responsável pelo aparecimento deste aroma. CANTONI et alii (1989) citam que apenas parte do ácido n-butírico e acético produzido é devido a ação de bactérias como *B. thermosphacta* e *Serratia liquefaciens*.

A temperatura é um fator importante no aparecimento de odores estranhos. GRIFFIN et alii (1982) trabalhando com contrafilé embalado a vácuo e utilizando filmes de média e alta barreira nas temperaturas de 20°C e 70°C, por diferentes períodos, encontraram menor incidência de odores estranhos em embalagens de média e alta barreira estocadas a 20°C do que a 70°C. Observaram que quanto maior o tempo de armazenamento do corte primário e subsequente acondicionamento do corte secundário maior a incidência de odores estranhos, concluindo que os cortes secundários a serem embalados a vácuo devem ser obtidos de peças que não foram

estocadas por períodos superiores a 10 dias pós abate. Relatam também que odores estranhos diminuam após 15 minutos da abertura da embalagem para a reavaliação. Os cortes com mais de 10 dias de armazenamento apresentaram tendência a maior incidência de odores desagradáveis, não aceitos pelo consumidor.

Em relação ao pH final da carne, um fator importante na manutenção da qualidade quando embalada a vácuo, é que este não seja maior do que 6,0, o que caracteriza uma carne DFD ("dark, firm and dry", escura, firme e seca) (DELAZARI, 1984; GREER, 1988; NEWTON & GILL, 1980). As carnes DFD quando embaladas a vácuo se tornam mais suscetíveis à deterioração (GILL & NEWTON 1979).

CAMPBELL et alli (1979) afirmaram que *B.thermosphacta* não cresce em condições anaeróbias se o pH da carne for menor ou igual a 5,8.

Uma das alterações que podem ocorrer em carnes com pH maior que 6,0 embaladas a vácuo é o esverdeamento, devido à produção de sulfomióglobina. Geralmente, esta alteração é causada por bactérias que podem se desenvolver sob baixas tensões de O_2 (*Pseudomonas mephitica* e *Alteromonas putrefaciens*) (NICOL et alli, 1970; SEELYE & YEARBURY, 1976; SEIDMAN & DURLAND, 1983). Estas bactérias são produtoras de H_2S a partir de aminoácidos sulfurados da carne (NICOL et alli, 1970). Quando a carne é exposta ao ar, a sulfomióglobina será oxigenada a oxissulfomióglobina que possui cor vermelha, porém a carne apresenta um odor modificado, característico de ovo podre (SEIDMAN & DURLAND, 1983). Para evitar esta alteração, não se deve utilizar carnes que possuam um

pH final elevado (acima de 6,0), GILL & NEWTON, 1979; TAYLOR, 1985; NICOL et alli, 1970). CANTONI et alli (1989) citam o aparecimento de odor sulfídrico em carne embalada a vácuo e armazenada a 5°C em que o agente era *Lactobacillus* produtor de H_2S .

Este pH também torna a carne mais susceptível ao desenvolvimento de *Yersinia enterocolitica* (SEELYE & YEARBURY, 1976). GILL & NEWTON (1979) encontraram um número de *Y. enterocolitica* 100 vezes maior em carne DFD, embalada a vácuo, do que a mesma com pH final normal. Já SELEY & YEARBURY (1979) isolaram *Y. enterocolitica* na 4ª semana de estocagem a 0 -2°C (em carne embalada a vácuo), concluindo que um pH final elevado favorece o crescimento deste microrganismo.

Outra alteração que a carne pode apresentar é a formação de manchas castanhas em sua gordura da superfície. Esta mancha é devida a concentração do composto heme no interior dos lipócitos e está associada à presença de leveduras. Dessas manchas isolou-se *Sacharomycopsis lipolitica* que, introduzida em carne fresca embalada a vácuo, produziu a mesma alteração (GRAU, 1978).

LIEBICH et alii (1986), aplicando monoglicerídeos acetilados (DFG- Dermatex Food Grade) numa concentração de 2% do peso da carne em embalagens com dois tipos de filme (Cryovac e Polietileno/Poliamida), verificaram que havia redução da perda de peso por exudação e prevenção da deterioração. E relatam uma vida de prateleira de 10 semanas para carne embalada em Cryovac e 8 semanas para carne embalada em Polietileno/Poliamida.

3.2. EMBALAGEM A VÁCUO

3.2.1. FILMES PLÁSTICOS UTILIZADOS

A embalagem da carne em filmes flexíveis possui duas funções principais: proteger o produto de danos físicos, modificações químicas e deterioração microbiana, e apresentar o produto para o consumidor da forma mais atrativa.

Normalmente, o processo a vácuo consiste, em linhas gerais, na retirada do ar da embalagem e posterior selagem, procurando-se manter o ambiente anaeróbio. (RIZVI, 1984).

Uma vez que o objetivo deste processo é manter um volume mínimo de ar dentro da embalagem durante o armazenamento, os laminados ou estrusados de filmes plásticos mais comumente utilizados devem possuir baixa permeabilidade ao oxigênio e gás carbônico (ROSSET, 1978).

As propriedades de barreira de um material polimérico são expressas em termos de permeabilidade ao oxigênio. (RIZVI, 1984). Este autor apresentou uma classificação dos filmes poliméricos de acordo com a sua permeabilidade ao oxigênio (Tabela 1).

TABELA 1- CLASSIFICAÇÃO DOS FILMES DE ACORDO COM A PERMEABILIDADE AO OXIGÊNIO

PERMEABILIDADE AO O ₂ (cc/m ² atm 90% U.R. 23°C)	BARREIRA
> 300	BAIXA
300 - 50	MÉDIA
50 - 10	ALTA
< 10	ULTRA ALTA

FONTE: RIZVI (1984)

De acordo com RIZVI (1981), a permeabilidade do filme ao oxigênio deve ser menor que 40 cm³ O₂/m²/dia/atm a 23°C e 0% de U.R., para retardar a conversão de mioglobina em metamioglobina na carne embalada a vácuo.

Existem alguns fatores que afetam a permeabilidade como: a natureza do agente penetrante; espessura do filme; a natureza de barreira do material; a composição do filme assim como possíveis danos mecânicos na embalagem e/ou na solda (GILBERT et alii, 1983). O efeito da temperatura na permeabilidade ao oxigênio é um importante fator a ser considerado na embalagem de carne. Há uma relação direta entre o aumento de temperatura e aumento da permeabilidade. Os filmes que contêm cloreto de polivinilideno são melhores barreiras ao oxigênio em temperaturas de refrigeração. (GEHRKE 1982).

Outros requisitos são a baixa permeabilidade a odores estranhos e várias propriedades físicas incluindo flexibilidade, transparência, resistência à gordura, não toxidez, resistência a baixas temperaturas, alta resistência mecânica (particularmente perfuração e abrasão), habilidade de formar selagens herméticas mesmo na presença de contaminantes (isto é suco da carne, gordura etc.) (EUSTACE, 1981; COLE JR., 1986); excelente termossoldabilidade, assim como ser passível de impressão e possuir estabilidade em várias temperaturas. (RIZVI, 1984).

Estes materiais utilizados podem ser laminados, coestrusados ou uma combinação de ambos. Além disso podem ser de dois tipos: encolhíveis e não encolhíveis. Os filmes encolhíveis são compostos normalmente por Acetato de etil vinila (EVA)/Cloreto de polivinilideno (PVdC)/EVA, EVA/PVdC/IONÔMERO ou Polipropileno (PP)/PVdC/EVA. Os filmes não encolhíveis têm a poliamida (PA) como base tais como PA/Polietileno (PE); PA/EVA; PA/IONÔMERO; PE/PA/EVA; PA/PE/EVA; PA/IONÔMERO/EVA e PA/IONÔMERO/PE. (RIZVI 1981; SACHAROW, 1974).

3.2.2. SISTEMAS DE EMBALAGEM A VÁCUO

Existem três sistemas básicos para se embalar a vácuo:

3.2.2.1 SISTEMA CRYOVAC

Utiliza-se um estrusado de EVA/PVDC/EVA ou outras estruturas termoencolhíveis. Após o acondicionamento, as embalagens são submetidas à vácuo mecânico e seladas por calor ou grampeadas mecanicamente. Posteriormente o conjunto, já fechado, é imerso em água, à temperatura de 80 a 90°C por 0,5 a 2 segundos (EFFENBERGER & SCHOTTI, 1972).

Ultimamente tem-se utilizado nesse sistema, embalagens combinadas de poliamida ou ionômero, que também podem ser seladas por calor ou grampo de metal. Em alguns casos, a permeabilidade ao oxigênio nestas embalagens é maior do que em embalagens Cryovac, mesmo assim é suficientemente baixa para se manter uma carne embalada a vácuo.

3.2.2.2 SISTEMA DE CÂMARA

A carne é acondicionada em uma bolsa pré-formada e o conjunto é colocado em uma câmara que é então fechada, e se produz um vácuo de 700 mmHg, fazendo com que o filme se colapse em torno da carne (MADI et alli, 1980). Posteriormente, faz-se a termosoldagem da abertura da bolsa, e finalmente se abre a câmara.

Os filmes utilizados são laminados ou coextrusados de vários polímeros. Entre eles estão os de nylon e de poliéster (na parte externa), que proporcionam boa resistência mecânica e boa barreira ao O₂. Na parte interna, usa-se polietileno de baixa densidade, ionômero ou EVA, que oferecem boa barreira ao vapor de água e boa termosoldabilidade.

A espessura dos componentes pode variar, sendo que os filmes de poliamida e de poliéster mais espessos são melhores barreiras à gases. Todavia, não são tão efetivos quanto àqueles que possuem EVA em sua composição (TAYLOR, 1985).

As embalagens utilizadas neste sistema não são termoencolhíveis e o exudato proveniente da carne tende a se acumular nos cantos da embalagem, durante o armazenamento. Porém, de acordo com BOWLING et alii (1977), não existem diferenças significativas entre os sistemas Cryovac e o de Câmara, em termos de perda por gotejamento.

3.2.2.3 SISTEMA DE EMBALAGEM EM BANDEJAS TERMOFORMADAS

é utilizado para bifes, entretanto, ultimamente tem sido aplicado para cortes secundários.

O processo pode ser resumido nas seguintes etapas:

- Após o aquecimento do filme este é colocado em moldes, para formar bandejas;
- o produto a ser embalado é colocado nesta bandeja;
- o conjunto (produto + bandeja) é então recoberto por um filme;
- um vácuo é produzido para a remoção de ar dentro da embalagem;
- posteriormente faz-se a termossoldagem da abertura da embalagem.

Os filmes utilizados para a bandeja termoformada são de poliamida, poliéster ou cloreto de vinila e os filmes para a cobertura são de polietileno, EVA ou ionômero. Este sistema é aplicável, particularmente para carne obtida por desossa à quente (TAYLOR, 1985).

3.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

3.3.1. PERDA DE PESO

A atividade de água da carne resfriada é muito alta e, portanto, a perda de peso por evaporação é quase certa. Além disso, a perda de peso ocorre também quando a carne é cortada. As proteínas miofibrilares são as principais responsáveis por ligação da água ao músculo. As variações do perfil de pH e temperatura são fatores que contribuem para a capacidade de retenção de água. (RENERRE, 1988).

Uma das características dos filmes plásticos utilizados para embalagem a vácuo é a baixa permeabilidade ao vapor de água e à umidade, portanto a perda de peso por evaporação é mínima. A temperatura é um outro importante fator no controle da perda de peso. Uma desossa realizada em ambiente com temperatura em torno de 10°C resulta em perdas significativamente menores do que a 60°C. A temperatura de armazenamento baixa (0 - 20°C) também diminui a perda de peso (BREIDSTEIN, 1982).

HODGES et alii (1974), estudando bifes embalados a vácuo encontraram valores desprezíveis de perda de peso até o 28º dia de armazenamento, em relação ao tempo decorrido entre o abate e o acondicionamento em embalagem, o tipo de corte ou o tempo de armazenamento. Já GRIFFIN et alii (1982) verificaram que houve um aumento de perda de peso com o aumento do tempo de estocagem, sendo que a permeabilidade do filme não afetou a perda de peso. SEIDMAN et alii (1976b) observaram que a perda de peso não era

afetada pelo nível de vácuo da embalagem.

JOHNSON (1974) apud (SEIDMAN & DURLAND, 1983) considerou como aceitável um volume de exudato entre 2 e 4% do peso da carne embalada a vácuo. Contudo, estes valores podem representar perdas econômicas substanciais se não forem controlados.

A influência do tipo da embalagem e monoglicerídeo acetilado foi pesquisada por LIEBICH et alii (1986). O monoglicerídeo (DFG) preveniu ou retardou no início da estocagem a perda de peso, sendo que esta ocorreu em maior escala em embalagens com laminados à base de polietileno do que nas do tipo "Cryovac". A perda de peso máxima encontrada foi de 6%.

BENSINK (1974) apud (SEIDMAN & DURLAND, 1983) estudou a perda de peso por exudação em cortes cárneos, encontrando valores entre 0,3 e 6,0 % dependendo da quantidade de gordura presente, fato também comprovado por SEIDMAN et alii (1976b).

SEIDMAN et alii (1979) observaram que as embalagens que possuíam 100% de nitrogênio apresentaram menores perdas de peso do que as embalagens a vácuo ou aquelas com 100% de gás carbônico. Isto sugere que o nitrogênio pode ser o responsável pela prevenção de grandes perdas de peso durante a armazenagem prolongada, enquanto que o gás carbônico (adicionado ou produzido na estocagem) pode se ligar às proteínas de uma maneira que altera sua capacidade de retenção de umidade.

A fim de se detectar diferenças entre o método de soldagem utilizados em embalagem a vácuo e perda de peso, BOWLING et alii (1977) constataram que a perda de peso por exudação em embalagens seladas por grampos ou termossoldáveis não apresentam di-

ferencias significativas

Já KEETON et alii(1988) trabalhando com embalagem "Cryovac" e adição de monoglicerídeo acetilado observaram que houve uma tendência de menor perda de peso nas embalagens com DFG durante toda a estocagem.

3.3.2. COR DA CARNE FRESCA

A cor da carne fresca é o índice de qualidade mais óbvio para que o consumidor a adquira, embora exista pouca correlação entre a cor vermelho brilhante e sua qualidade.

A cor das carnes frescas está associada à concentração relativa dos três estados químicos da mioglobina (pigmento heme) presente: mioglobina reduzida (Mb) de coloração vermelho púrpura; mioglobina oxigenada (O_2Mb) de coloração vermelho brilhante; e mioglobina oxidada ou metamioglobina (MetMb) de coloração marrom. (KROPF et alli, 1985; RIZVI, 1981).

A mioglobina, também conhecida como deoximioglobina, possui o íon Fe no estado ferroso (Fe^{2+}). Este pigmento está presente na carne imediatamente após a desossa, e combina-se com o oxigênio atmosférico, formando a oximioglobina. (KROPF et alli, 1985)

A O_2Mb só se forma se o íon Fe estiver no estado ferroso (LIVINGSTON & BROWN, 1981) e é favorecida por uma pressão parcial de oxigênio maior que 40 mmHg (RIZVI, 1981).

Sob pressões reduzidas de O_2 (1 a 4 mmHg) ocorre a oxidação de Fe reduzido para a sua forma férrica (Fe^{3+}), resultando na formação de metamioglobina.

As reações entre Mb, O_2Mb e MetMb são reversíveis e estão em equilíbrio dinâmico, com constante interconversão entre as três formas.

Quando um corte de carne, que foi exposto ao ar, é fatiado perpendicularmente à superfície, três diferentes camadas de

cor podem ser visualizadas. A superfície mais externa é vermelho brilhante devido à oxigenação da Mb a oximioglobina. A camada mais profunda apresentará coloração vermelho púrpura da mioglobina, devido à ausência de O_2 . Uma fina camada marrom de metamioglobina aparecerá entre as duas, pois a pressão parcial de O_2 na aquela porção promove a sua formação. (TAYLOR, 1982)

Segundo ROSSET (1978), os fatores que afetam a formação de metamioglobina são:

- capacidade redutora da carne: a oxidação enzimática dos substratos endógenos do músculo, particularmente a glicose, produz coenzimas redutoras que continuamente reduzem a metamioglobina a mioglobina e o ciclo continua se o oxigênio estiver presente. Assim que os substratos oxidáveis são esgotados, o poder redutor do músculo é perdido. Então, os íons Fe do pigmento heme são oxidados a metamioglobina.
- Temperatura: o aumento da temperatura aumenta o fenômeno de oxidação.
- Composição da atmosfera gasosa em contato com a carne (% de gás carbônico e oxigênio): é um fator diretamente ligado ao tipo de embalagem adotado

Já SACHAROW (1974) afirmou que a formação de metamioglobina depende da temperatura, carga microbiana e pH.

3.3.2.1. INFLUÊNCIA DA EMBALAGEM A VÁCUO NA COR DA CARNE FRESCA

A utilização de embalagem a vácuo modifica a composição gasosa em que a carne está submetida, criando um ambiente de baixas tensões de oxigênio. Também contribui para isso a baixa permeabilidade dos filmes plásticos utilizados neste processo. (RIZVI, 1981). Esta baixa permeabilidade restringe a entrada de grandes quantidades de oxigênio e, por isso, a coloração desta carne é vermelho púrpura (presença de mioglobina) (TAYLOR, 1985). A exposição da carne ao oxigênio, antes da embalagem, permite que este se ligue à superfície do músculo. O vácuo remove o oxigênio da embalagem, porém, não necessariamente, da superfície do músculo (COLE JR, 1986).

A carne pode possuir uma camada de oximioglobina em sua superfície até que seja submetida ao vácuo. Há também uma fina camada de metamioglobina, todavia a maioria do corte possui o pigmento na forma de mioglobina. Com o tempo, o O_2 residual é consumido pelos tecidos até uma concentração de 0,1% ou menos (BREIDSTEIN, 1982) e há a formação de gás carbônico dentro da embalagem pela ação da respiração bacteriana. Isto se traduz em uma diminuição da oximioglobina e um aumento da metamioglobina (KROPF et alli, 1985). PIERSON et alii (1970) relataram que esta formação inicial de metamioglobina só acontece durante poucas horas após a embalagem a vácuo. Posteriormente a metamioglobina é reduzida à mioglobina. Esta redução ocorre, em maior ou menor escala, dependendo da capacidade redutora do músculo (KROPF et alli, 1985). A embalagem a vácuo deve ser feita, no máximo, 15 minutos após o

corte, para minimizar a formação de metamioglobina. (COLE JR, 1986) Quando a embalagem a vácuo é aberta, a cor púrpura de mioglobina oxigena e, então, se torna vermelho vivo. (TAYLOR, 1985).

A temperatura de armazenamento possui efeito na descoloração e na taxa de acúmulo de mioglobina. O tipo de músculo utilizado influi na estabilidade da cor e o efeito da luz na descoloração é pequeno. A permeabilidade ao oxigênio, como fator isolado, não é um critério suficiente de qualidade, pois existem outros fatores que interferem na cor da carne. O pH não influencia na descoloração. (HOOD, 1980).

SEIDMAN et alii (1976b), utilizando cortes de carne embalados a vácuo armazenados sob refrigeração durante 35 dias, não encontraram diferenças significativas em relação à descoloração de carne submetida a níveis de vácuo baixo, intermediário e alto. Entretanto os valores numéricos para os cortes submetidos a alto vácuo se mostraram maiores, minimizando a descoloração superficial e realçando a aparência da cobertura de gordura. Eles sugerem que este fato é devido ao maior espaço de ar residual nas embalagens submetidas a baixos níveis de vácuo. Estes espaços poderiam conter grandes quantidades de CO₂ que descolorem a superfície da carne.

A embalagem de cortes secundários difere do primário na cor. Em grandes cortes a relação de ar residual/carne é baixa o suficiente para assegurar a rápida depleção de oxigênio. Porém, com cortes menores, a relação é alta e a formação consequente de metamioglobina pode descolorir a superfície do corte. É essencial que o processo de embalagem a vácuo de cortes secundários

seja imediatamente executado após o corte e com o mínimo de ar residual, a fim de se obter uma cor desejável. (SEIDMAN et alii 1976b)

GILBERT (1981) apud GILBERT (1983) utilizou inóculos iniciais de microrganismos para verificar a estabilidade da cor na carne embalada a vácuo. Os inóculos iniciais foram de $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ e $2 \times 10^2/\text{cm}^2$, utilizando-se um filme de polietileno/polipropileno, com armazenamento a 3°C, no escuro. Ele constatou que a peça que possuía maior contagem inicial começou a apresentar uma coloração insatisfatória após 3 dias de estocagem, enquanto que aquela com baixa contagem manteve uma cor satisfatória após 7 dias. A carga microbiana neste período era de 3×10^5 UFC/cm² (para inóculo inicial alto) e 7×10^3 UFC/cm² (para inóculo inicial baixo).

O efeito do gás carbônico na descoloração foi verificado por SEIDMAN et alii (1979) através do uso de carne bovina embalada em atmosfera modificada de 100% de gás carbônico, comparada à embalagem a vácuo. As amostras embaladas com atmosfera modificada apresentaram maior descoloração de superfície. Fato semelhante é relatado por FINNE (1982).

O intervalo de tempo entre a desossa e a embalagem a vácuo influi na cor da carne. Quanto maior o tempo, maior a descoloração. (PAGLIARO et alii, 1972). Os mesmos autores utilizaram carne embalada a vácuo em filmes termoencolhíveis, que foram submetidos a um banho em água a 90-96°C durante 1 a 3 segundos. Verificaram que quanto maior o tempo de banho, maior a descoloração. GRIFFIN et alii (1982) revelaram quase completa reoxigenação e

desenvolvimento da cor vermelho-vivo após 15 minutos da abertura da embalagem. Não foram encontradas diferenças, em relação a cor, entre tipo de embalagem, temperatura de estocagem ou aumento do tempo e estocagem.

LIEBICH et alii (1986) utilizando monoglicerídeos acetilados observaram que apenas as amostras tratadas com DFG retornaram à sua coloração normal. Já KEETON et alii (1988) não observaram diferenças significativas entre amostras de carne bovina embalada a vácuo, adicionadas ou não de monoglicerídeo acetilado, em relação à descoloração.

3.4. ADITIVOS COMESTÍVEIS DE COBERTURA DA CARNE ("EDIBLE COATINGS")

A fim de prolongar a vida de prateleira, reduzir a perda de peso e melhorar as características sensoriais da carne, foram pesquisados muitos aditivos de cobertura comestíveis ("edible coatings"). MOLLINS (1987), adicionando polifosfatos a 1% em pernil suíno ("butts"), armazenado de 2 a 4°C, indicou que houve uma redução da contagem de mesófilos e psicrotróficos após 6 dias em relação ao controle.

RAO & SREENIVASAMURTHY (1986), utilizando cortes de biceps femoris de carneiro embalados em polietileno e adicionados de uréia em concentrações de 5,8 e 10% (p/p), não observaram efeito bactericida.

Monoglicerídeos acetilados já foram utilizados em carne bovina, suína e de aves e vísceras, a fim de protegê-las contra a desidratação durante a estocagem (STEMMLER & STEMMLER 1974 apud KESTER 1986; BARTELS et alii, 1973; KEETON et alii, 1988). Os monoglicerídeos acetilados consistem de glicerina parcialmente ou completamente esterificada com uma mistura de ácido acético e ácidos graxos comestíveis ("fat-forming fatty acids") (LUCE, 1967).

Monoglicerídeos completamente acetilados contêm dois radicais acetil mais um radical de ácido graxo de cadeia longa. Os monoglicerídeos parcialmente acetilados são misturas de moléculas, cada uma contendo um radical de ácido graxo de cadeia longa

ou 0 a 2 radicais acetil e 2 a nenhum grupo hidroxila. Por exemplo, em um monoglicerídeo 50% acetilado metade dos grupos hidroxila foram substituídos por radicais acetila, enquanto que um monoglicerídeo 70% acetilado, 70% dos grupos hidroxila foram substituídos por radicais acetila. (LUCE, 1967).

O aumento da acetilação aumenta as propriedades de barreira e a resistência destes à passagem de umidade, uma vez que esta é altamente dependente do gradiente de pressão de vapor de água através do filme (KESTER, 1986). De acordo com KEETON et alii (1988), outros monoglicerídeos acetilados semelhantes à óleo são disponíveis e foram testados em cortes de carne bovina e de carneiro. Um tipo de monoglicerídeo - "Dermatex Food Grade" (EASTMAN KODAK) reduziu a "purga", aumentou a vida de prateleira, retardou a descoloração e protegeu contra a queima pelo frio. (BARTELS et alii, 1972; LIEBICH et alii, 1986). Estes últimos autores (LIEBICH et alii, 1986), utilizando microscopia de varredura sobre a carne adicionada de DFG, verificaram que este aditivo forma um filme ou película protetora sobre a carne, que iria se desfazendo-se com o aumento da estocagem.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram adquiridas peças de contrafilé (*Longissimus dorsi*), as quais foram subdivididas em porções de peso médio de 923,10 g em um matadouro frigorífico no estado de São Paulo.

O pH de cada corte foi determinado com medidor de pH portátil. Os cortes que apresentaram pH maior que 5,8 foram rejeitados.

4.1. ACONDICIONAMENTO DOS CORTES

Os cortes, após pesagem, foram embalados em estrusados comerciais BARRIER BAG e BAG VAC com as seguintes dimensões: 23 cm de largura e 30 cm de altura com solda lateral.

Os tratamentos aplicados foram os seguintes:

Tratamento A - "BARRIER BAG" controle

Tratamento B - "BARRIER BAG" + 2 % de "Dermatex Food Grade"

Tratamento C - "BAG VAC" controle

Tratamento D - "BAG VAC" + 2% de "Dermatex Food Grade" (DFG)

Em cada embalagem, de acordo com os tratamentos, foi colocado um corte de carne. Adicionou-se o DFG, na proporção de 2%(p/v) do peso médio da peça de carne, com o auxílio de uma seringa graduada, devidamente dimensionada para a adição do mesmo em cada embalagem.

Todas as embalagens foram seladas, duas a duas em embaldora à vácuo SELOVAC, até se obter um vácuo de 27 pol Hg, medido no Vacuômetro da mesma.

Posteriormente, os cortes já embalados foram submersos em um banho de água a 82°C por 3 segundos, para se permitir o encolhimento do filme ("Barrier Bag") ou a soldagem das paredes da embalagem ("Bag Vac").

As amostras de carne foram colocadas em caixas de papelão e então lacradas.

O transporte destas caixas do Frigorífico até a UNICAMP, foi feito em caminhão frigorífico, equipado com "Termoking", com temperatura ajustada entre 0 e 2°C.

As caixas, contendo as amostras, foram armazenadas em refrigerador com temperatura controlada entre 0 e 2°C, até o fim do experimento.

4.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

No planejamento experimental foram alocadas ,aleatoriamente, 3 unidades experimentais(amostras de contrafilé) para cada um dos 4 tratamentos e realizadas análises em 7 períodos definidos. Foi atribuído um número, de 1 a 84,para cada uma das amostras.

TABELA 2 -DESENHO EXPERIMENTAL UTILIZADO

TRATAMENTO												
PERÍODO	I	A1		I	B		I	C		I	D	
0 dias	I	14*	49 40	I	32 84	21	I	63 17	41	I	82 04	39
12 dias	I	57	77 71	I	73 60	69	I	05 65	70	I	02 55	35
24 dias	I	09	01 10	I	06 53	21	I	30 42	31	I	15 59	79
36 dias	I	29	72 78	I	56 66	07	I	16 36	68	I	67 58	50
44 dias	I	34	48 45	I	08 20	11	I	54 76	52	I	13 75	33
52 dias	I	47	03 43	I	51 44	38	I	23 19	83	I	62 22	64
60 dias	I	46	37 24	I	74 26	28	I	27 18	25	I	81 61	80

- 1 A= "Barrier Bag" controle * nº das amostras sorteadas
B= "Barrier Bag" + 2% de DFG
C= "Bag Vac" controle
D= "Bag Vac" + 2% de DFG

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância foi feita utilizando-se o logarítmo da contagem das amostras individuais. Quando as médias das contagens foram diferentes ($P < 0,05$), utilizou-se a TESTE de DUNCAN para separá-las.

4.4. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

As determinações microbiológicas foram feitas a cada 12 dias, até o 36º dia e a cada 8 dias até o 60º dia de armazenamento, visando observar possíveis mudanças na microbiota.

Devido à impossibilidade física de realizar todas as determinações microbiológicas de nosso interesse em apenas uma etapa experimental, a pesquisa foi conduzida em duas etapas. Na primeira, foram avaliados os microrganismos deterioradores e na segunda etapa os microrganismos patogênicos seguindo o planejamento experimental indicado em 4.2. em ambas etapas. O acondicionamento das porções para a segunda etapa também foi realizado de acordo com o item 4.1.

4.4.1. MICRORGANISMOS DETERIORADORES

As embalagens foram abertas assepticamente e foi feita a contagem da superfície da carne , utilizando-se zaragatoas ("swabs") de algodão (LEE & FUNG, 1986) em uma área de 25cm², medida com um molde de alumínio.

Os "swabs" foram colocados em tubos contendo água peptonada 0,1% (p/v) e foram homogeneizados em Ciclomixer. Esta suspensão foi utilizada como inóculo nas determinações que seguem.

4.4.1.1 DETERMINAÇÕES

A. CONTAGEM TOTAL DE AERÓBIOS (SPECK, 1976).

Meio utilizado: PCA- Agar Padrão de Contagem (DIFCO)

Incubação: 30°C por 48 horas

B. CONTAGEM TOTAL DE ANAEROBIOS (LANARA, 1981).

Meio utilizado: PCA -Agar Padrão de Contagem (DIFCO)

Incubação: 37°C por 48 horas em jarra de anaerobiose

C. CONTAGEM TOTAL DE PSICOTRÓFICOS (LANARA, 1981).

Meio utilizado: PCA - Agar Padrão de Contagem (DIFCO)

Incubação: 5 a 7°C por 7 a 10 dias

Identificação: Foram coletadas 3 colônias de cada placa, referentes a cada amostra e foram transferidas para caldo Trypticase Soy (DIFCO) e incubadas a 30°C por 2 a 3 dias. Estas culturas foram transferidas para o meio de ágar Trypticase Soy (DIFCO) e incubadas a 30°C por 24 horas

A partir deste meio foram feitos testes de coloração de Gram, metabolismo oxidativo/fermentativo, oxidase, catalase, fermentação de glicose, arginina deidrolase, motilidade e crescimento em ágar Mac Conkey. Foram utilizados os esquemas de identificação propostos por VANDERZANT & NICKELSON (1969). (Figuras 1, 2 e 3).

A metodologia por nós utilizada para a determinação da porcentagem da distribuição desta microbiota se baseou na proporção entre o número total de isolados e a frequência do microrganismo identificado.

D. CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS (LANARA, 1981).

Meio utilizado: PDA - Potato Dextrose Agar (Merck) acidificado com ác. tartárico 10%, pH 3,5.

Incubação: 30°C por 3 a 5 dias

F. CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁTICAS (SPECK, 1976).

Meio utilizado: MRS Broth (MERCK) +1,5% de ágar

Incubação: 30°C por 48 a 72 horas

G. CONTAGEM DE *Brochothrix thermosphacta* (GARDNER, 1966).

Meio utilizado: Estreptomicina-Acetato taloso-actidiona (STAA)

Incubação: 22°C por 48 horas

Após contagem das colônias em placa, foi feito o teste de oxidase. GARDNER (1966) indicou que apesar do caráter seletivo do STAA, pode haver crescimento de *Pseudomonas*. É necessário então realizar prova de oxidase (por meio de papel de filtro embebido na solução teste) e subtrair o valor obtido no teste positivo da contagem total, no meio utilizado (STAA). A diferença foi computada como contagem de *B. thermosphacta*.

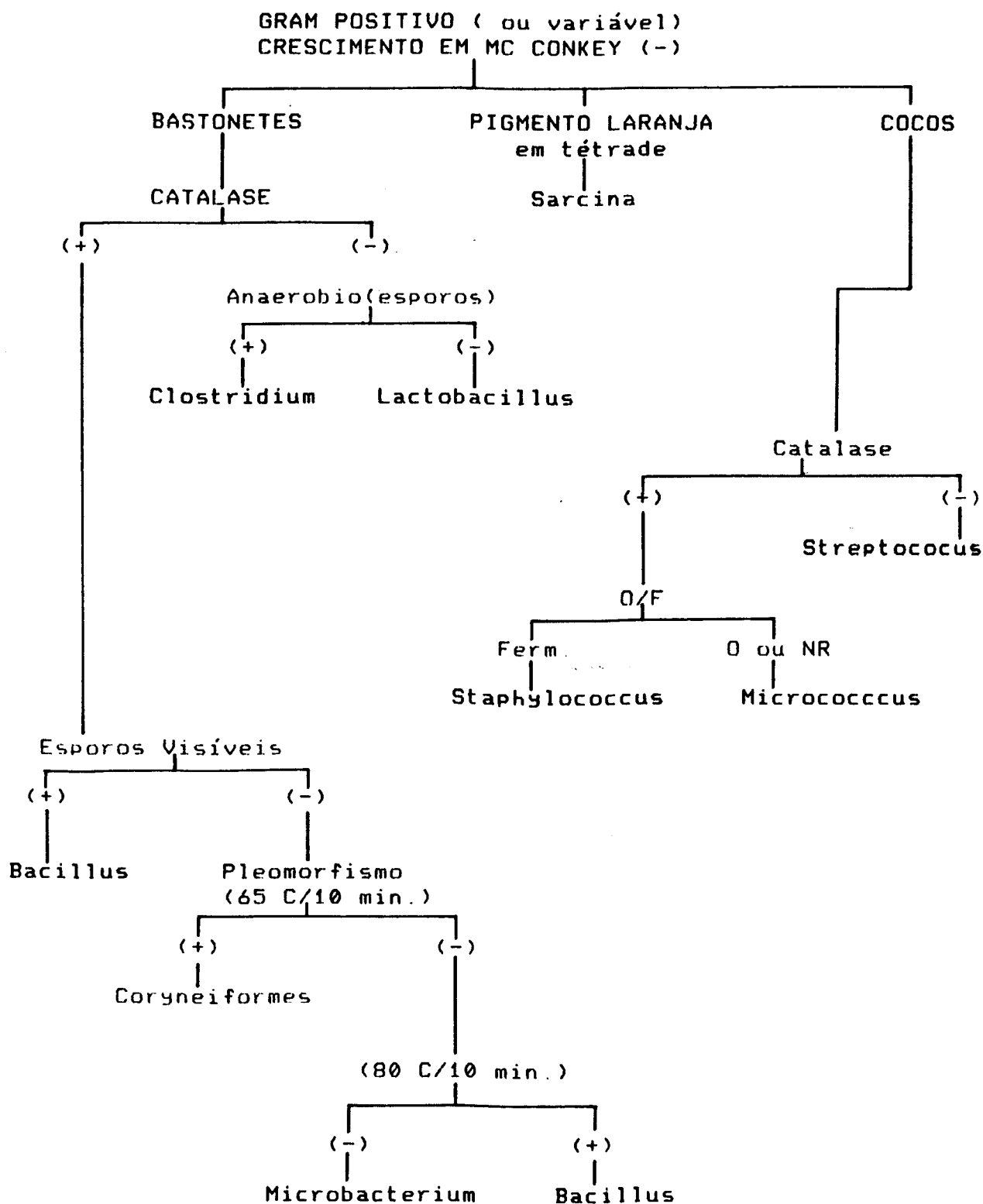
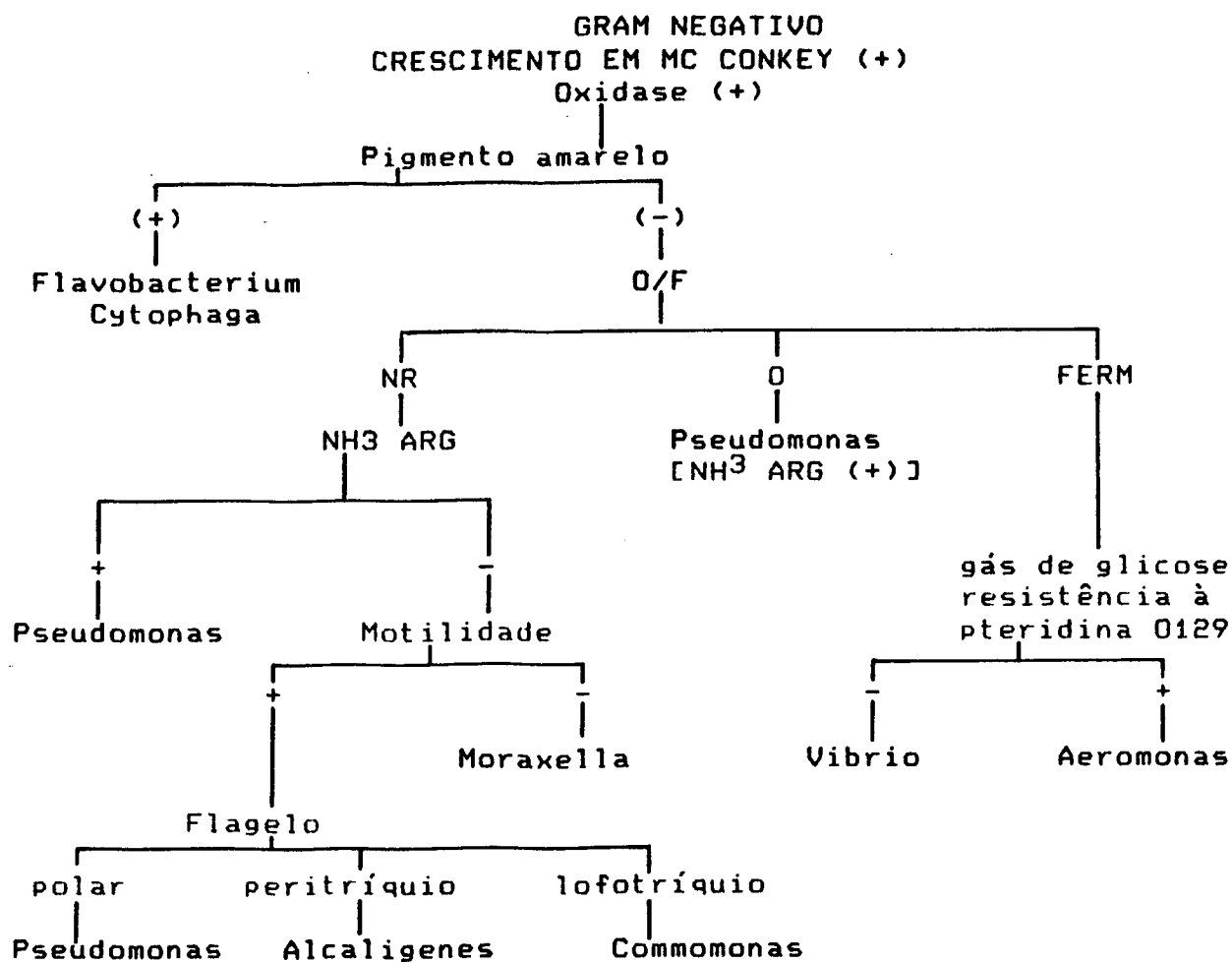
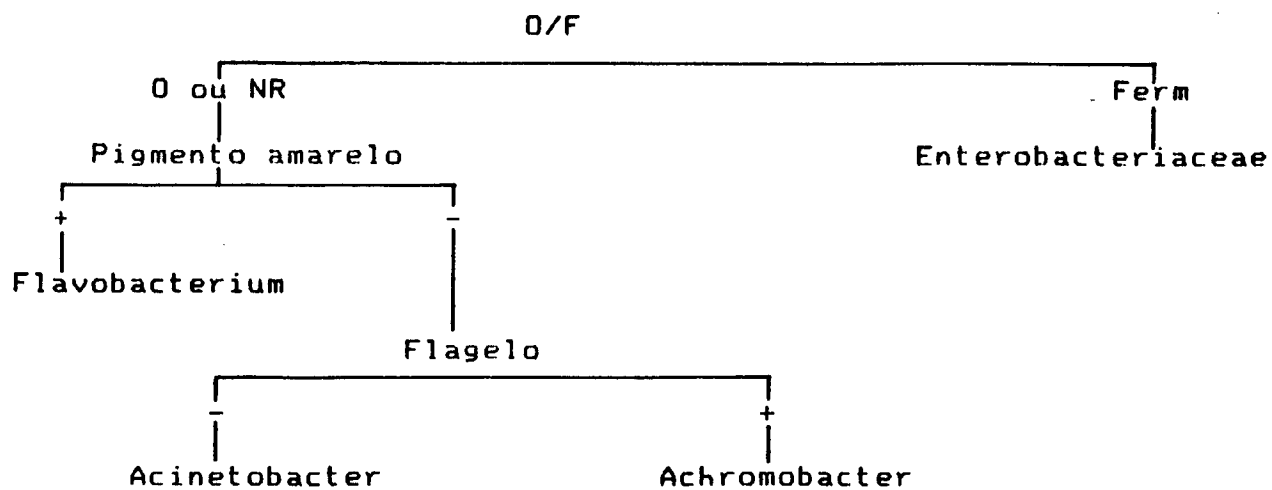


FIGURA 1 - CHAVE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS GRAM POSITIVOS
Fonte: VANDERZANT & NICKELSON (1969)



GRAM NEGATIVO
CRESCIMENTO EM MC CONKEY (+)
oxidase (-)



O/F- Teste de Hughteifson(metabolismo oxidativo
ou fermentativo)
O- Oxidativo
FERM- Fermentativo
NR- Não reativo

FIGURA 3 - CHAVE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS GRAM
NEGATIVOS OXIDASE NEGATIVOS
Fonte: VANDERZANT & NICKELSON (1969)

4.4.2. MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS

Em uma segunda etapa as amostras foram abertas assepticamente e foi feita a contagem de superfície da carne em uma área de 25 cm², utilizando um molde de alumínio e "swabs".

Os "swabs" foram homogeneizados com água peptonada 0,1%(p/v), em ciclomixer, para todas as determinações. Foram feitas diluições decimais e estas foram utilizadas como os inóculos.

4.4.2.1 DETERMINAÇÕES

A. CONTAGEM DE *Clostridium perfringens* (SPECK, 1976)

Meio utilizado. Triptose Cicloserina Gema de Ovo-TSC

Incubação: 37 °C por 48 horas em jarra de anaerobiose.

Confirmação. Foram contadas as placas que apresentaram colônias típicas (negras com halo claro). Foram selecionadas todas colônias com estas características e transferidas para tubos de tioglicolato fluido e incubadas por 24 horas a 37°C, quando então a coloração de Gram foi feita. A partir dos tubos de tioglicolato fluido que apresentaram crescimento, foram feitos testes de nitrato motilidade e lactose gelatina. Para o teste de nitrato motilidade os tubos foram incubados a 35 - 37°C por 24 horas. Para o teste de lactose gelatina os tubos foram incubados a 35 - 37°C por 24 a 44 horas. Também foi realizado o teste de reação de Nagler.

B. CONTAGEM DE ENTEROBACTÉRIAS (KENNEDY Jr. et alli, 1982).

Meio utilizado. VRBA -Violet Red Bile Agar (DIFCO) + 1,0% de glicose

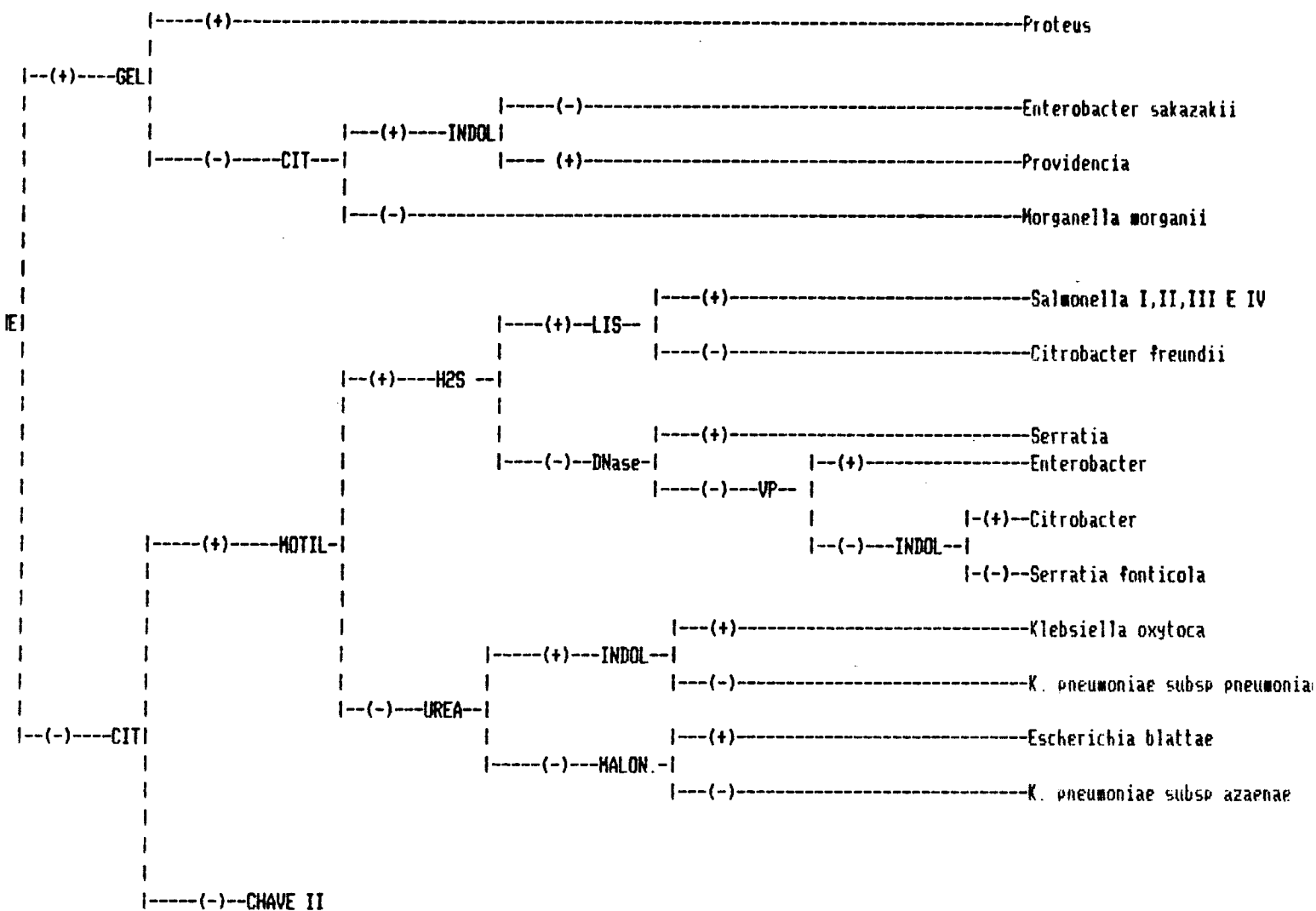
Incubação: 30°C por 48 horas

Identificação: Foram escolhidas 3 colônias ao acaso de placas representando cada amostra e estas foram transferidas para Triplicase soy agar e incubadas a 37°C por 24 horas. Foram feitos, então, os seguintes testes (EDWARDS & EWING, 1972):

TSI, urease, indol, vermelho de metila, Vogues Proskauer, citrato de Simmon's, fenilalanina deaminase, motilidade, lisina descarboxilase, DNase a 25°C e gelatinase. Os esquemas de identificação se encontram nas figuras 4 e 5.

C. DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS (SPECK, 1976).

Utilizou-se a técnica do Número Mais Provável, empregando-se uma série de três tubos. As diluições utilizadas foram 0,1, 0,01, 0,001 ou 0,01, 0,001 e 0,0001, em função do tempo de estocagem.



PHE = FENILALANINA DEAMINASE

H2S = PRODUÇÃO EM TSI

GEL = GELATINASE A 22oC

VH = TESTE DE VERMELHO DE METILA

VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER

LIS = LISINA DESCARBOXILASE

CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO

URE = UREASE

MOT = MOTILIDADE

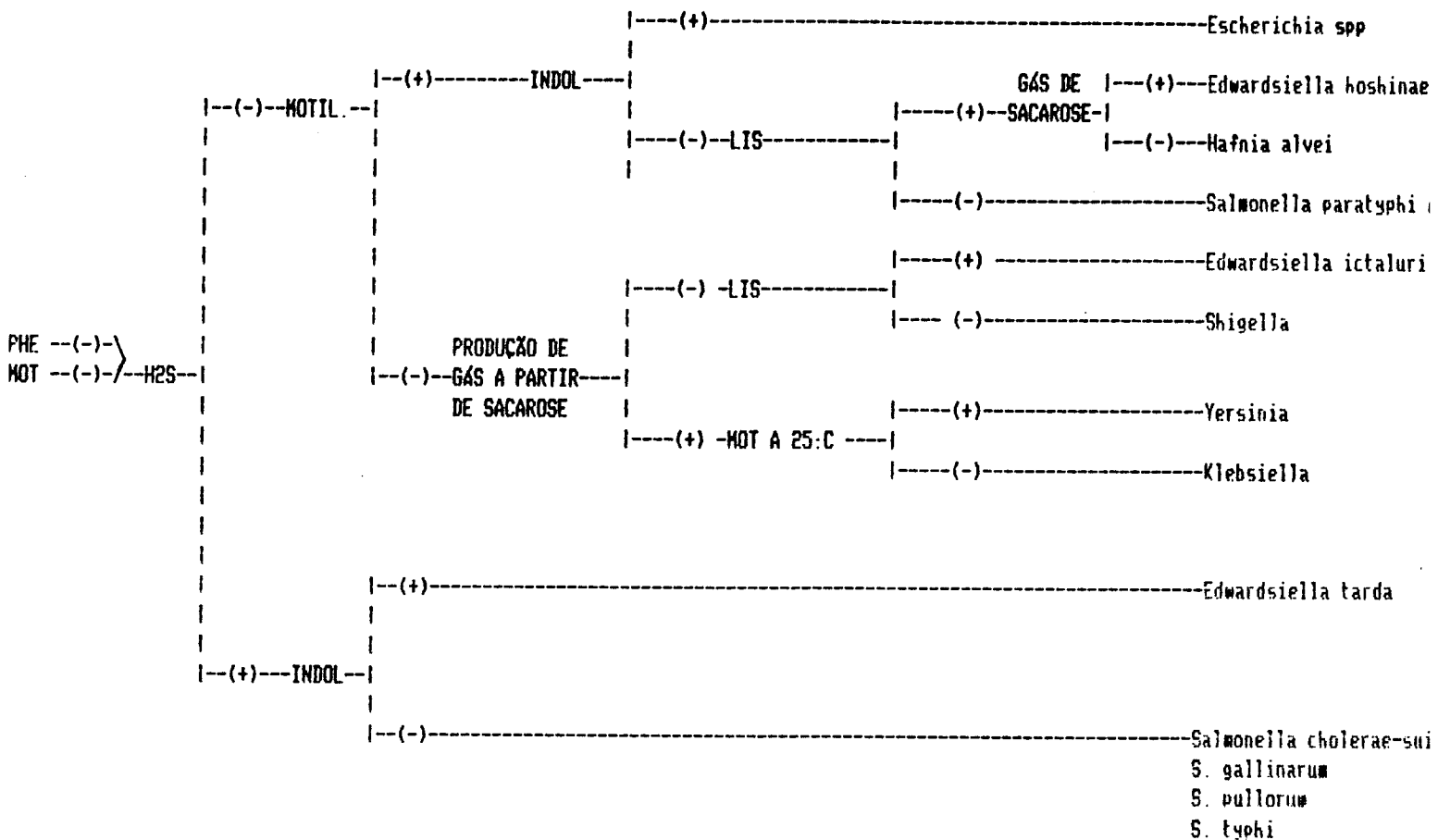
IND = INDOL

DNase = PRODUÇÃO A 25oC

GÁS DE SACAROSE = PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

FIGURA 4 - CHAVE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE BASTONETES GRAM NEGATIVOS, OXIDASE NEGATIVOS

CHAVE II



PHE = FENILALANINA DEAMINASE
 HPS = PRODUÇÃO EM TSI
 GEL = GELATINASE A 22oC
 VH = TESTE DE VERMELHO DE METILA
 VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER
 LIS = LISINA DESCARBOXILASE

CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO
URE = UREASE
MOT = MOTILIDADE
IND = INDOL
DNase = PRODUÇÃO A 25°C
GÁS DE SACAROSE = PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

FIGURA 5 - CHAVE PARA A IDENTIFICAÇÃO DE BASTONETES GRAM NEGATIVOS, OXIDASE, FENILALANINA E CITRATO NEGATIVOS

D. DETERMINAÇÃO DE *Salmonella* (LANARA, 1981).

Para esta determinação, tomou-se uma porção de 25g de cada amostra de carne da área adjacente à área onde se fez a amostragem por "swab", colocando-se esta porção em 225ml de caldo tetratationato. Este meio foi incubado a 43°C por 24 horas.

Tomando-se uma alçada deste meio, se fez um inóculo por esgotamento em ágar verde brilhante e ágar bismuto sulfito, incubando-se a 37 °C por 24 e 48 horas respectivamente.

As colônias típicas foram inoculadas em TSI (triple Sugar Iron Agar) e LIA (Lisine Iron Agar) e incubados a 35°C por 24 h.

Nos tubos de testes anteriores que deram resultados característicos para o microrganismo, foram feitos testes de urease, degradação do malonato e desaminação de fenilalanina e indol. Não foram feitos testes sorológicos.

E.DETERMINAÇÃO DE *Yersinia enterocolitica* (MEHLMAN et alli, 1978).

Foi transferido 1 ml do tubo de água peptonada 0,1% (p/v) que continha o "swab" para 10 ml de caldo de enriquecimento (solução salina tamponada contendo 1% (p/v) de sorbitol e 0,15% (p/v) de sais biliares). Este foi incubado a 42°C por 21 dias.

Foi tomada 1 alçada deste meio de enriquecimento, fazendo-se um tratamento alcalino, em um tubo estéril contendo 0,1 ml de solução de NaCl 0,5% (p/v) e 0,5% (p/v) de KOH, através de agitação por 30 segundos (AULISIO et alli, 1980), sendo esgotada em Agar MacConkey e incubando-se a 26°C por 48 horas. Foram isoladas 3 colônias referentes a cada amostra (num total de 252 isolados), que apresentaram diâmetro de 1 a 1,5 mm sem coloração e transparentes. Foram posteriormente transferidas para Trypticase Soy Agar e submetidas aos seguintes testes bioquímicos: fermentação de açúcares (TSI - 37°C por 24h) e uréia (37°C por 24 horas). As culturas que se apresentaram como uréia positiva e TSI com fundo e superfície ácidos e ausência de gás foram posteriormente submetidas aos testes de motilidade a 25°C e 37°C, utilização de citrato a 25°C, teste de Voges Proskauer a 25°C, indol a 37°C e produção de ácido de rafinose a 37°C.

F. CONTAGEM DE *Staphylococcus aureus* (LANARA, 1981).

Meio utilizado: Ágar Baird-Parker (DIFCO)

Incubação: 37°C por 30 a 48 horas

Foram contadas as colônias que se apresentaram negras com halo claro transparente.

Confirmação: Foram selecionadas colônias típicas e foi feita a coloração de Gram. As culturas que se apresentaram como cocos Gram positivos foram transferidas para caldo BHI e foram incubadas a 37°C por 24 horas. Foram feitos testes confirmativos de coagulase e termonuclease.

Coagulase: plasma de coelho oxalatado. Incubação a 37°C por 4 horas.

Termonuclease: placas contendo ágar azul de toluidina DNA. Incubação a 37°C por 4 horas em câmara úmida.

4.5 DETERMINAÇÕES FÍSICAS

4.5.1. DETERMINAÇÃO DE PERDA DE PESO

As amostras, antes de serem embaladas, foram pesadas no frigorífico e o seu peso anotado.

Após a amostragem microbiológica de cada período, e em todos os tratamentos, as embalagens foram totalmente retiradas, e as amostras foram pesadas novamente após o excesso de suco ter sido retirado com papel absorvente. A diferença entre o peso inicial e o peso quando da amostragem foi computada como a perda de peso.

4.5.2. DETERMINAÇÃO DO pH

O pH foi determinado em cada amostra de carne em todos os tratamentos, durante os períodos de amostragem.

Foram pesados 3g de amostra e homogeneizados com 27ml de água destilada. Desta mistura determinou-se o pH, utilizando-se um phmetro da marca Micronal.

4.5.3. AVALIAÇÃO DO ODOR

O odor foi avaliado pelos pesquisadores, no momento da abertura da embalagem para a amostragem microbiológica. Esta análise subjetiva consistiu em se caracterizar o odor como aceitável ou não para carne bovina maturada, sob o ponto de vista do consumidor. O experimento foi encerrado quando todas as amostras apresentaram odores não característicos do produto.

4.5.4. DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE DO FILME AO OXIGÊNIO

A fim de se caracterizar os filmes plásticos utilizados neste trabalho, a permeabilidade ao oxigênio foi determinada pelo método de sensor Coulométrico (OXTRAN 100 TWIN) (ASTM D3985-81).

A área efetiva de permeação foi de 100 cm². Durante o teste o fluxo de oxigênio foi de 5 ml/minuto e do gás de arraste (N₂/H₂) foi de 5 ml/minuto. O condicionamento das amostras secas foi realizado durante 2 dias a 26°C a 0% de umidade relativa (obtida pela utilização de sílica/solução supersaturada de NaCl). Para as amostras úmidas o condicionamento foi feito durante 15 dias a 23°C em um ambiente com umidade relativa de 75%.

Após a determinação da perda de peso das amostras, foram realizados cortes nas peças e o seu interior foi exposto ao ar frio (10 °C) durante 20 minutos (FELÍCIO*, comunicação pessoal). Após esse tempo foi realizada uma avaliação subjetiva da cor, através de notas que variaram entre 0 (muito ruim) e 5 (muito boa).

*Dr. Pedro Eduardo de Felício. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

5.1.1. MICRORGANISMOS DETERIORADORES EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

Nas tabelas 3 a 9 são apresentados os resultados obtidos das contagens de microrganismos deterioradores, especificados no item 4.4.1.

Para verificar a qualidade higiênico-sanitária da carne utilizada foram coletadas amostras de contra-filé (sem embalagem) no mesmo dia do início do experimento (24 horas pós-abate) e submetidas a contagem de microrganismos deterioradores, sendo os resultados apresentados na tabela 3. As contagens obtidas foram baixas (variando de $< 1,0$ até $2,53 \log \text{UFC/cm}^2$), indicando boas práticas higiênicas durante o abate e a desossa, conforme LEE & FUNG 1986 e KEETON et alii 1988

TABELA 3 - CONTAGENS DE MICRORGANISMOS DETERIORADORES EM CONTRAFILÉ (SEM EMBALAGEM). (pH $< 5,8$)

DETERMINAÇÃO	Log UFC/cm ²¹
contagem total de aeróbios mesófilos	2,42
contagem total de anaeróbios	2,07
contagem de bactérias lácticas	2,23
contagem de psicrotróficos	2,53
contagem de bolores e leveduras	$< 1,00$
contagem total de <i>Brochothrix thermosphacta</i>	$< 2,00$

1 - Média de três amostras

TABELA 4 - CONTAGEM¹ (LOG UFC/cm²) DE AERÓBIOS MESÓFILOS
EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO (DIAS)	TRATAMENTOS ²				ORDEM DAS MÉDIAS ³
	A	B	C	D	
0	2,72 ^{bc}	2,54 ^{bc}	2,21 ^b	2,32 ^b	<u>A B D C</u>
12	1,63 ^c	2,21 ^c	1,95 ^b	1,89 ^b	<u>B C D A</u>
24	4,68 ^{ab}	3,95 ^{abc}	4,51 ^{ab}	3,63 ^{ab}	<u>A C B D</u>
36	5,37 ^{ab}	5,08 ^{ab}	5,65 ^a	5,44 ^a	<u>C D A B</u>
44	5,78 ^a	5,22 ^{ab}	5,60 ^a	5,59 ^a	<u>A C D B</u>
52	5,97 ^a	5,88 ^a	5,79 ^a	5,71 ^a	<u>A B C D</u>
60	5,51 ^{ab}	5,68 ^a	5,74 ^a	5,72 ^a	<u>C D B A</u>

1- média de 3 amostras por tratamento

2- A-"Barrier Bag"

B-"Barrier Bag" + 2% DFG

C-"Bag Vac"

D-"Bag Vac" + 2% DFG

a,b,c - médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem
(P>0,05)

3- Médias na mesma linha que possuem traço contínuo comum não diferem (P>0,05)

Na tabela 4 são apresentados os resultados da contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos para os 4 tratamentos durante o período de estocagem (zero a 60 dias).

Conforme observa-se na tabela 4, as maiores contagens de aeróbios mesófilos ocorreram após 52 dias de armazenamento sendo 5,97; 5,88 e 5,79(logUFC/cm²) para os tratamentos A,B e C. Para o tratamento D a maior contagem ocorreu aos 60 dias. Não foi observado, entretanto, aparecimento de odores pútridos em nenhum dos 4 tratamentos até o final do período de armazenamento. Contu-

do, a partir de 44 dias de armazenamento houve aparecimento de odores ácidos (butírico, acético), conforme indicado na tabela 37. Não se observou, até 60 dias de armazenamento contagens acima de $6,00 \log \text{ UFC/cm}^2$. LEE & FUNG (1986) indicam que, de uma maneira geral, contagens em superfície de carnes maiores que $\log 7 \text{ UFC/cm}^2$ são inaceitáveis sob o ponto de vista de deterioração; valores entre 5 e $6 \log \text{ UFC/cm}^2$ são considerados questionáveis, quanto a qualidade do produto. Já SEIDMAN et alii (1976a), trabalhando com carne bovina embalada a vácuo e armazenada por 35 dias sob refrigeração, obtiveram contagem de mesófilos de $6,82 \log \text{ UFC/cm}^2$, valor que é superior àqueles obtidos neste trabalho. Esta diferença pode estar relacionada com a baixa contagem inicial das amostras utilizadas neste experimento.

O maior aumento de contagem entre períodos foi verificado entre o décimo segundo e o vigésimo quarto dia de armazenamento, para todos os tratamentos, resultado este que está de acordo com os citados por SEIDMAN et alii (1976c) que observaram um aumento na contagem de aeróbios mesófilos no período inicial do experimento (14 a 21 dias de estocagem). No entanto JAYE et alii (1962) observaram uma diminuição de contagem entre o décimo e décimo segundo dia de estocagem a $1,10^\circ\text{C}$. SUTHERLAND et alii (1975), utilizando contrafilé embalado a vácuo e estocado por nove semanas, encontraram uma fase "lag" na 1ª semana para a contagem total de aeróbios. Em nosso experimento, esta fase se estendeu por 12 dias.

Aos 24, 36, 44 e 52 dias os tratamentos que utilizaram DFG apresentaram contagens menores de aeróbios mesófilos do que

os respectivos controles, sendo que houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas nos períodos de 24 e 52 dias de armazenamento, onde o tratamento A apresentou as maiores contagens. Estes dados concordam, em parte, com os obtidos por KEETON et alii (1988) que trabalharam com bifes bovinos armazenados durante 7 semanas a 20°C, a fim de analisar o efeito do DFG. Eles obtiveram, aos 35 dias de estocagem, contagens menores (0,5 unidade de log UFC/cm²) nas embalagens que continham o monoglicerídeo acetilado, não sendo porém esta diferença significativa ($p > 0,05$).

Há uma relação direta entre o tempo de estocagem e o aumento das contagens de aeróbios mesófilos em todos os tratamentos, porém os dados são inconsistentes para se poder afirmar, de forma conclusiva, qualquer efeito do DFG quanto aos resultados das contagens de aeróbios.

Comparando-se os 7 períodos dentro de cada tratamento, não se detectaram diferenças significativas ($p > 0,05$) nas contagens de aeróbios mesófilos a partir de 24 dias de armazenamento.

Na figura 6 são representados em gráfico os dados da tabela 4.

Pode-se observar que há um decréscimo de contagem no período de 12 dias, devido possivelmente, à adaptação dos microrganismos ao ambiente refrigerado e ao efeito restritivo da atmosfera proporcionada pela embalagem. Este fenômeno acontece também com as determinações de microrganismos psicotróficos e bactérias lácticas (figuras 8 e 9). SEIDMAN et alii (1976c) encontraram resultados semelhantes e sugeriram que poderia ser causado pela imersão das embalagens em água quente, processo este que poderia destruir ou

causar injúrias subletais aos microrganismos, estendendo, portanto, seu período de adaptação. Acreditamos que o decréscimo inicial é devido principalmente à redução da disponibilidade de oxigênio do ambiente, na embalagem.

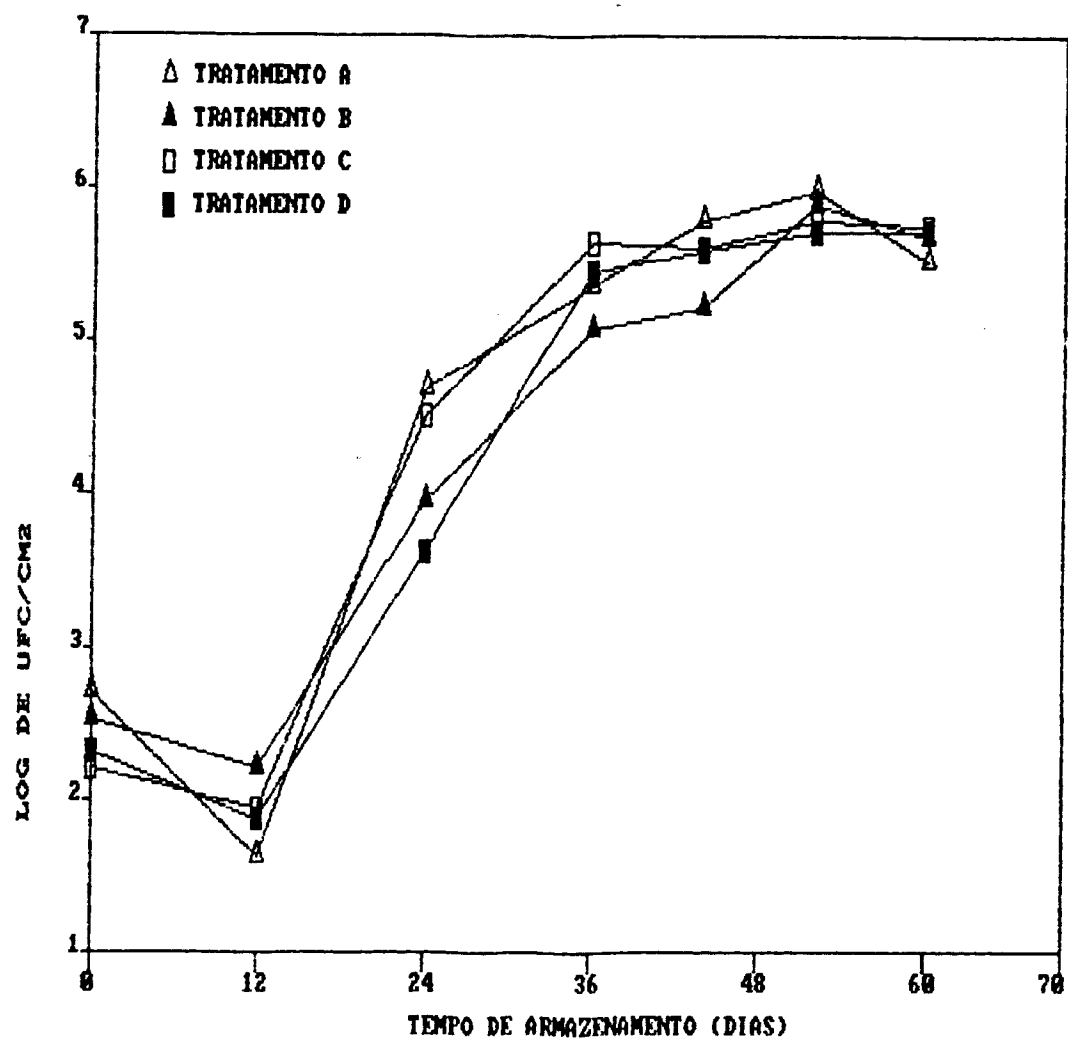


FIGURA 6 - CONTAGEM DE AERÓBIOS EM CONTRAFILÉ
EMBALADO A VÁCUO ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO.

TABELA 5 - CONTAGEM¹ (LOG UFC/cm²) DE ANAERÓBIOS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO (DIAS)	TRATAMENTOS ²				ORDEM DAS MÉDIAS ³
	A	B	C	D	
0	0,20 ^b	1,11 ^{bc}	0,99 ^c	0,77 ^b	<u>B C D A</u>
12	1,58 ^b	0,76 ^c	1,33 ^{bc}	0,83 ^b	<u>A C D B</u>
24	3,32 ^{ab}	2,71 ^{abc}	3,14 ^{abc}	2,56 ^{ab}	<u>A C B D</u>
36	2,11 ^{ab}	4,58 ^{ab}	3,48 ^{abc}	3,84 ^{ab}	<u>B D C A</u>
44	5,37 ^a	4,64 ^{ab}	5,06 ^{ab}	4,64 ^a	<u>A C B D</u>
52	5,85 ^a	5,70 ^a	5,56 ^a	5,57 ^a	<u>A B D C</u>
60	5,92 ^a	5,68 ^a	5,59 ^a	5,54 ^a	<u>A B C D</u>

1- média de 3 amostras por tratamento

2- A-"Barrier Bag"

B-"Barrier Bag" + 2% DFG

C-"Bag Vac"

D-"Bag Vac" + 2% DFG

a,b,c - médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem (P>0,05)

3- Médias na mesma linha que possuem traço contínuo comum não diferem (P>0,05)

Na tabela 5 são apresentados resultados da contagem de anaeróbios. Observa-se o aumento de 3,26 ciclos logarítmicos no tratamento A no período compreendido entre o 36º e 44º dia de armazenamento, enquanto que para os outros 3 tratamentos (B,C e D) a maior diferença foi verificada no período entre 12 e 24 dias, com uma variação de 1,95;1,98 e 1,70 ciclos log para cada tratamento, respectivamente.

Observou-se também um decréscimo acentuado desta população entre 24 e 36 dias para o tratamento A, o qual não acompanhou a tendência de aumento da população apresentada pelos tratamentos B, C e D. No entanto não foi possível detectar a causa desta diminuição.

Não houve diferença significativa, a nível de 5%, entre os tratamentos na contagem de anaeróbios, em um mesmo período de armazenamento, exceto no período de 44 dias, quando os tratamentos B e D apresentaram as menores contagens ($4,64 \log \text{UFC/cm}^2$). O tratamento A apresentou as maiores contagens em 5 períodos (12, 24, 44, 52 e 60 dias) sendo que, de todas as contagens desta determinação a maior foi observada aos 60 dias ($5,92 \log \text{UFC/cm}^2$). Cabe indicar que, conforme apresentado na tabela 36, a permeabilidade do filme ao oxigênio utilizado no tratamento A foi inferior à permeabilidade do filme do tratamento C (em condicionamento úmido). Este fator pode ter contribuído para favorecer o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios e/ou microaerófilos no tratamento A.

Para todos os tratamentos, o aumento do tempo de armazenamento levou a um aumento numérico das contagens. SIMMARD et alii (1982), SEIDMAN et alii (1976a) e HODGES et alii (1974) trabalhando com a carne bovina embalada a vácuo e armazenamento sob refrigeração, obtiveram resultados semelhantes.

Notou-se que a partir do 24º dia não há diferença significativa, a nível de 5%, comparando-se todos os períodos dentro de um mesmo tratamento.

Pode-se observar na figura 7 que não existe decréscimo na contagem de microrganismos anaeróbios, exceto no tratamento B, aos 12 dias. Isto se explica pelo fato de que a embalagem cria um ambiente propício para o desenvolvimento destes microrganismos, ocorrendo então um aumento de contagem até o final da estocagem. É portanto importante que a carga de microrganismos anaeróbios inicial seja baixa, particularmente em carnes destinadas à embalagem a vácuo.

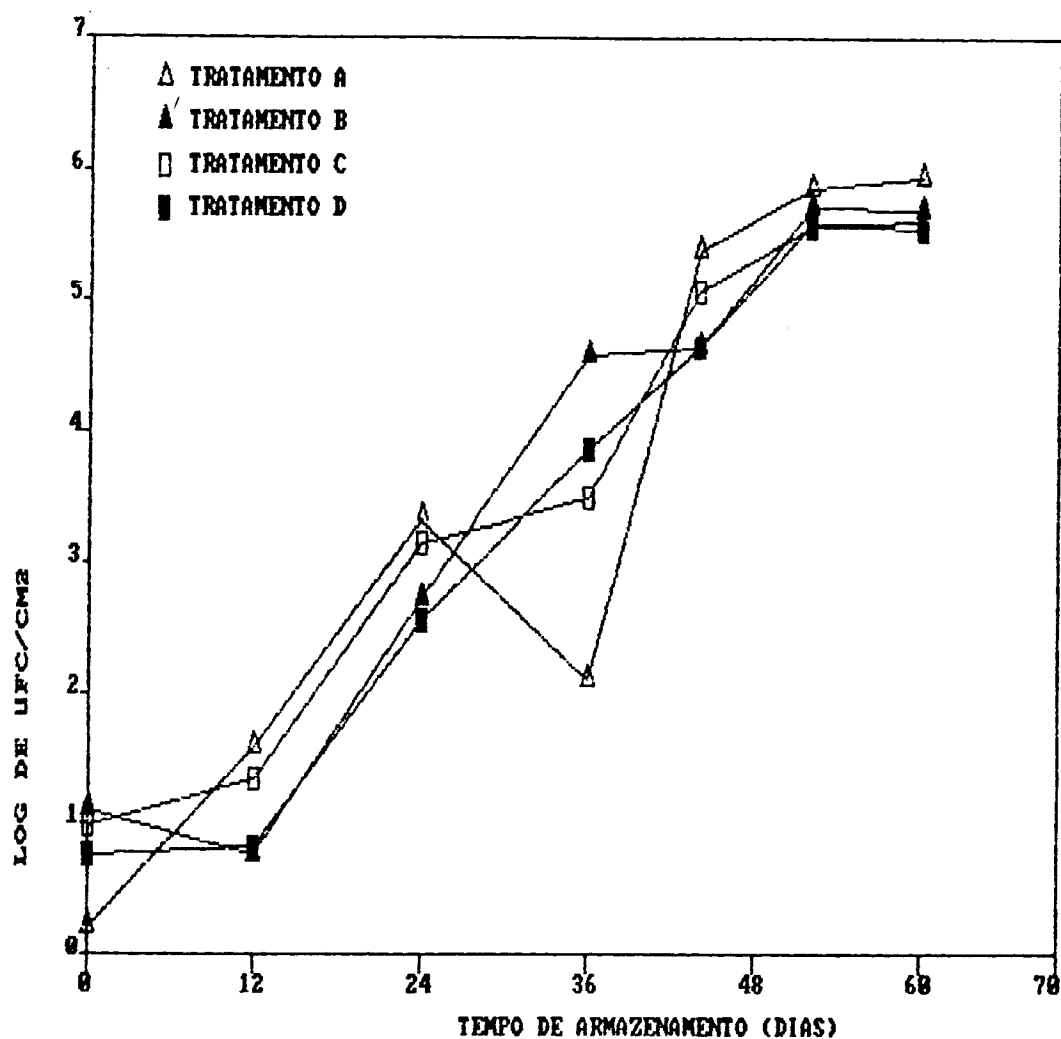


FIGURA 7- CONTAGEM DE ANAERÓBIOS EM CONTRAFILÉ
 EMBALADO A VÁCUO ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO

TABELA 6 - CONTAGEM¹ (LOG UFC/cm²) DE PSICROTRÓFICOS EM CONTRA-
FILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO -----TRATAMENTOS ² -----	ORDEN DAS				MÉDIAS ³
DIAS)	A	B	C	D	
0	3,34 ^{ab}	2,92 ^{ab}	3,16 ^{ab}	2,68 ^{bc}	<u>A C B D</u>
12	1,82 ^b	2,26 ^b	1,26 ^b	1,39 ^c	<u>B A D C</u>
24	3,75 ^{ab}	3,89 ^{ab}	4,41 ^a	3,67 ^{abc}	<u>C B A D</u>
36	5,33 ^a	5,12 ^a	5,61 ^a	5,23 ^{ab}	<u>C A D B</u>
44	5,81 ^a	5,14 ^a	5,59 ^a	5,52 ^{ab}	<u>A C D B</u>
52	5,86 ^a	5,69 ^a	5,78 ^a	5,63 ^a	<u>A C B D</u>
60	5,66 ^a	5,56 ^a	5,40 ^a	5,38 ^{ab}	<u>A B C D</u>

1- média de 3 amostras por tratamento

2- A- "Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C- "Bag Vac"

D- "Bag Vac" + 2% DFG

a,b,c- médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem
(P)0,05)

3- Médias na mesma linha que possuem traço contínuo comum não
diferem (P)0,05)

A tabela 6 apresenta os dados da contagem de psicrotrófi-
cos. Também, nesta determinação, não foram observadas diferenças
significativas entre as médias de contagem para os 4 tratamentos
em um mesmo período. O maior aumento na contagem foi verificado
no período entre 12 e 24 dias de armazenamento, resultado este
similar ao encontrado por CHRISTOPHER et alii (1980) que obser-

varam dentro da contagem de psicrotróficos, um maior incremento entre 14 e 21 dias de estocagem.

Apesar de não haver diferença significativa ($p > 0,05$) o tratamento D foi o que apresentou as menores contagens nos períodos zero, 24, 52 e 60 dias e o tratamento A as maiores contagens (períodos 0, 44, 52 e 60 dias), sendo que, aos 52 dias, este tratamento apresentou a maior contagem entre todas, desta determinação.

Neste experimento, no início da estocagem, a contagem era de 2,68 a 3,34 log UFC/cm² e aos 36 dias 5,12 a 5,61 log UFC/cm². Já SEIDMAN et alii (1976a) encontraram no início de armazenamento 0,59 log/cm² e aos 35 dias 6,08 log/cm².

Para todos os tratamentos houve diminuição numérica da contagem entre 0 e 12 dias e 52 e 60 dias. Também CHRISTOPHER et alii (1980), trabalhando com carne bovina embalada a vácuo, armazenada por 21 dias, encontraram contagens ao zero dia de 2,79 log de UFC/in² e aos 21 dias 5,02 log/in², observando também um aumento das contagens durante o armazenamento.

O comportamento dos microrganismos mostrado na figura 8 indica que, a partir de 36^o dia há uma estabilização nas contagens, com tendência a um decréscimo após 52 dias.

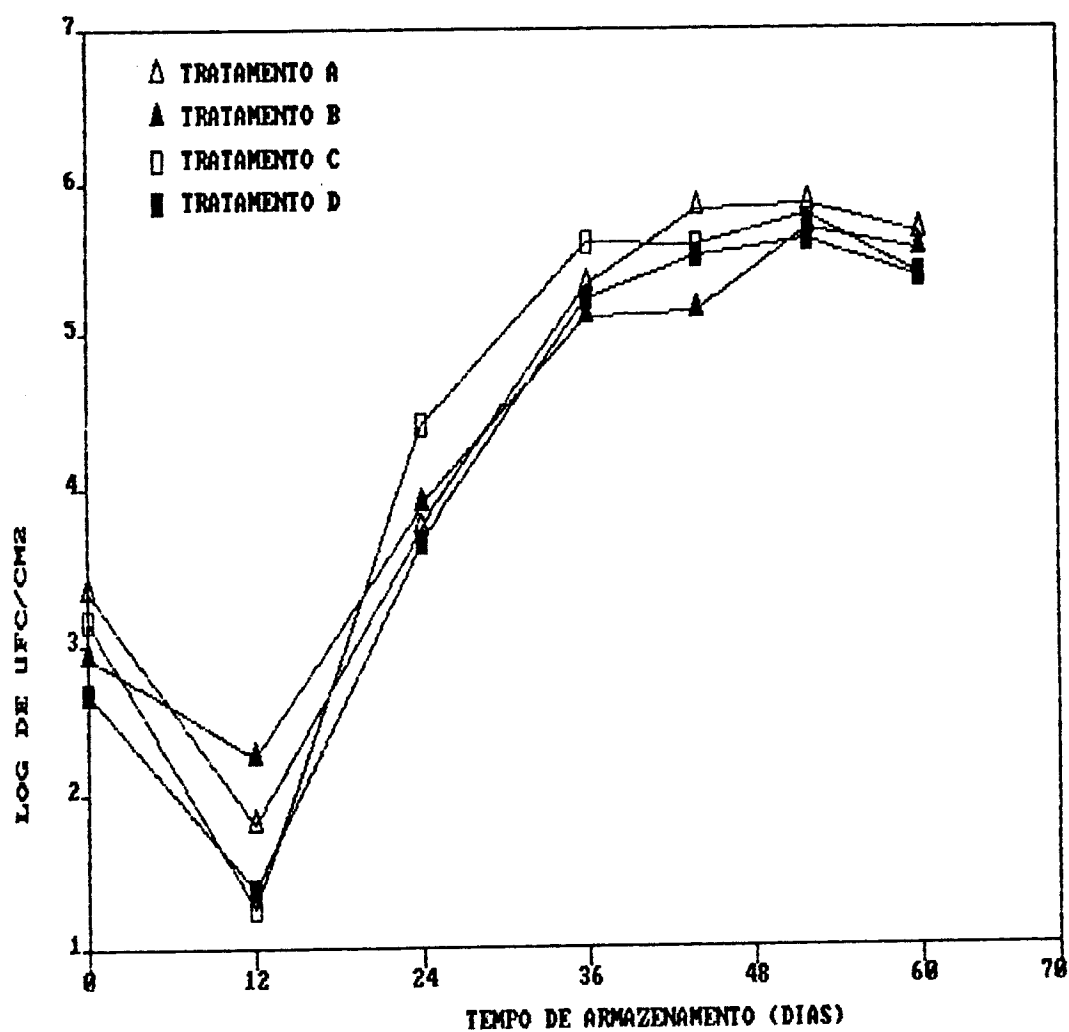


FIGURA 8- CONTAGEM DE PSICROTRÓFICOS EM CONTRAFILÉ
EMBALADO A VÁCUO ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO

TABELA 7 - CONTAGEM¹ (LOG UFC/cm²) DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO (DIAS)	TRATAMENTOS ²				ORDEM DAS MÉDIAS ³
	A	B	C	D	
0	1,30 ^b	2,04 ^b	1,71 ^b	1,81 ^b	<u>B D C A</u>
12	1,31 ^b	1,89 ^b	1,23 ^b	1,00 ^b	<u>B A C D</u>
24	4,63 ^a	3,19 ^{ab}	3,49 ^{ab}	3,64 ^{ab}	<u>A D C B</u>
36	4,94 ^a	4,90 ^{ab}	5,59 ^a	5,61 ^a	<u>D C A B</u>
44	5,07 ^a	4,72 ^{ab}	5,17 ^a	5,60 ^a	<u>D C A B</u>
52	5,69 ^a	5,69 ^a	6,29 ^a	5,63 ^a	<u>C A B D</u>
60	5,60 ^a	5,46 ^a	5,37 ^a	5,45 ^a	<u>A B D C</u>

1- média de 3 amostras por tratamento

2- A- "Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C- "Bag Vac"

D- "Bag Vac" + 2% DFG

a,b - médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem
(P>0,05)

3- Médias na mesma linha que possuem traço contínuo comum não diferem (P>0,05)

Da análise estatística dos dados da tabela 7, que apresenta as médias de contagens de bactérias lácticas, não se verificam diferenças significativas entre os tratamentos, em um mesmo período de armazenamento. Ao contrário, KEETON et alii (1988) encontraram diferença significativa, ($p < 0,05$), entre o contrafilé embalado a vácuo e aquele adicionado de DFG, nos períodos de 35 e 49 dias de armazenamento sob refrigeração.

Como para todas as determinações anteriores, o maior aumento da contagem entre períodos foi verificado entre 120 e 240 dia de armazenamento. CHRISTOPHER et alii (1980) encontraram um decréscimo na contagem de *Lactobacillus* aos 7 dias de estocagem.

Após o trigésimo sexto dia de armazenamento as contagens se tornaram aproximadamente constantes em torno de 10^5 UFC/cm². Estes resultados estão de acordo com LIEBICH et alii (1986) que encontraram contagens de 10^2 /g no início da estocagem e aos 21/28 dias encontraram 10^4 /g.

No período de 52 dias todos os tratamentos apresentaram as maiores contagens, sendo que a maior entre todas correspondeu ao tratamento C (6,29 log UFC/cm²). Neste período os tratamentos A, B e D apresentaram contagens de 5,69; 5,69 e 5,63 l(log UFC/cm²) respectivamente. Para KEETON et alii (1988) a maior contagem obtida para o controle foi aos 49 dias, enquanto que para a carne adicionada de DFG foi aos 35 dias.

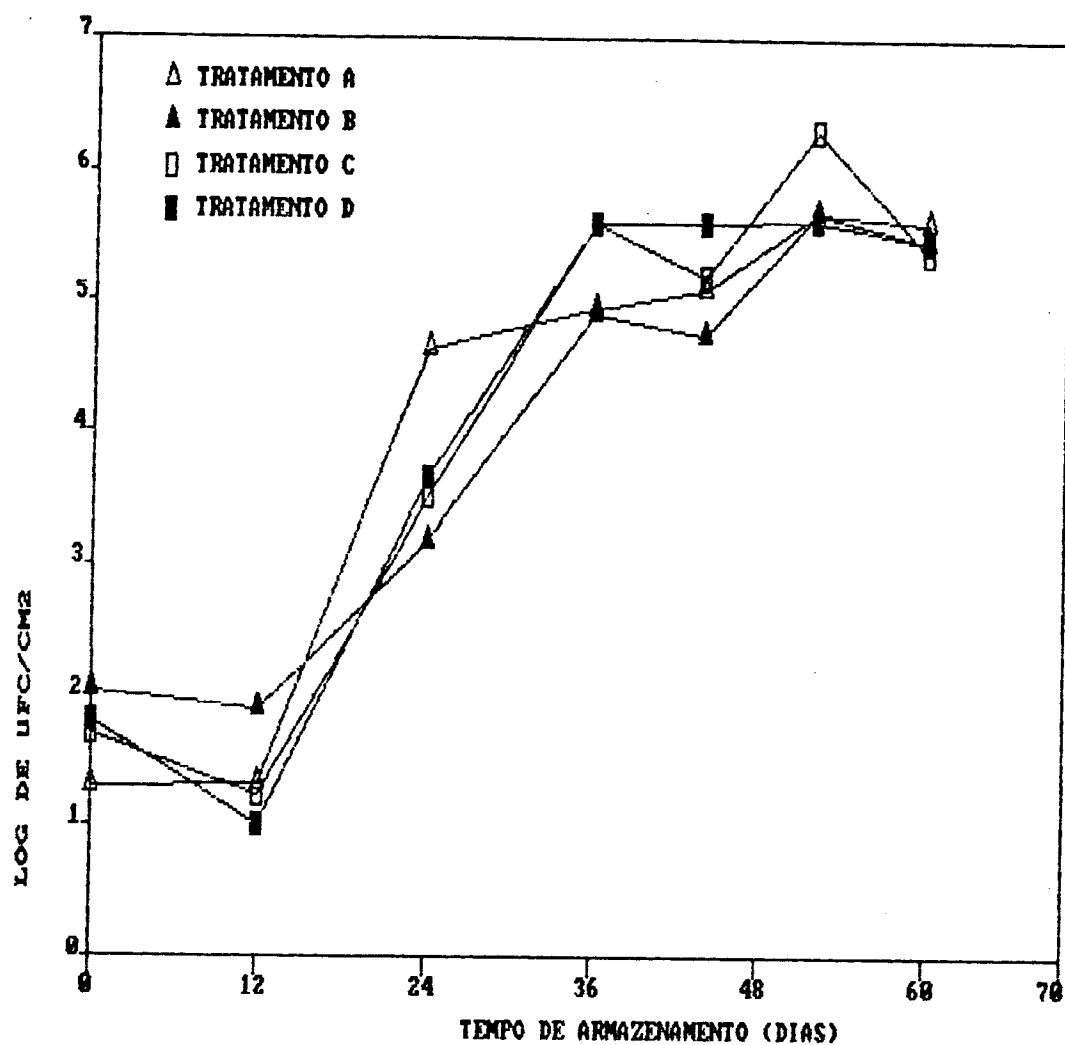


FIGURA 9- CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁTICAS EM CONTRAFILÉ
EMBALADO A VÁCUO ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO

TABELA 8 - CONTAGEM¹ (LOG UFC/cm²) DE *Brochothrix thermosphacta* EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO (DIAS)	TRATAMENTOS ²				ORDEM DAS MÉDIAS ³
	A	B	C	D	
0	<2,00*	<2,00	<2,00	<2,00	
12	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	
24	0,22 ^a	0,83 ^a	1,79 ^a	0,41 ^b	<u>C B D A</u>
36	0,38 ^a	0,43 ^a	1,21 ^a	0,92 ^a	<u>C D B A</u>
44	2,16 ^a	0,99 ^a	0,83 ^a	1,16 ^a	<u>A D B C</u>
52	1,22 ^a	1,50 ^a	1,61 ^a	0,74 ^a	<u>C B A D</u>
60	0,33 ^a	0,76 ^a	1,36 ^a	0,60 ^a	<u>C B D A</u>

1- média de 3 amostras por tratamento

2- A- "Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C- "Bag Vac"

D- "Bag Vac" + 2% DFG

a- Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem

(P>0,05)

*- Logaritmo da contagem estimada

3- Médias na mesma linha que possuem traço contínuo comum não diferem (P>0,05)

A tabela 8 apresenta os dados da contagem de *B. thermosphacta*. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos ou por períodos de estocagem. Os valores de contagem apresentados permaneceram numa faixa de 0,22 a 2,16 (log UFC/cm²). Nota-se que no final da estocagem as contagens diminuíram em todos os tratamentos. Estes resultados encontram-se de

acordo com os dados relatados por CAMPBELL et alii (1979) que estudando o crescimento de *B. thermosphacta* inoculado artificialmente em carne bovina embalada a vácuo, verificaram que não ocorreria crescimento, quando o pH era inferior a 5,8 e a permeabilidade da embalagem ao oxigênio era baixa. Através desses dados podemos sugerir que, nessa pesquisa, houve uma associação entre esses dois fatores o que levou as baixas contagens observadas. Já SIMMARD et alii (1983) observaram um aumento no número de *B. thermosphacta* de 3% para 24% a 49 dias de estocagem sob refrigeração.

Quando se compara as médias de contagem de *B. thermosphacta* e de bactérias lácticas, verifica-se que no período entre 12 e 24 dias, há a maior diminuição de contagem do primeiro e o maior aumento do segundo, sugerindo uma inibição de crescimento do *B. thermosphacta* pelas bactérias lácticas. Este antagonismo também foi verificado por ROTH & CLARK (1975) que supõem que este fato ocorra devido à produção de um agente antimicrobiano pelos lactobacilos, e não por competição por espaço ou nutriente.

Na determinação de bolores e leveduras em contrafilé embalado a vácuo foram obtidas contagens inferiores a $1,0 \log \text{ UFC/cm}^2$, em todos os períodos e todos os tratamentos. Este fato era esperado, uma vez que o ambiente criado nas embalagens a vácuo é anaeróbico/microaerófilo não favorecendo o desenvolvimento destes microrganismos.

Não foi observada nenhuma contagem maior ou igual a 7 ($\log \text{ UFC/cm}^2$) em todos os resultados da quantificação da microbiota deterioradora realizada até o 60º dia de armazenamento sob refrigeração.

5.1.2. IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA PSICOTRÓFICA

As colônias isoladas das placas de contagem de psicrótróficos foram identificadas através dos testes especificados em 4.4.1.1.C. Os resultados dos testes bioquímicos estão nas tabelas de 10 a 14, para cada período de armazenamento.

A distribuição da população microbiana (expressa em porcentagem dos microrganismos isolados) está apresentada na tabela 9. Estes dados estão representados na figura 10.

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO¹ DA POPULAÇÃO MICROBIANA PSICOTRÓFICA EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VACUO ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO (0 - 2°C).

Gênero/Família/ grupo	PERÍODO (DIAS)				
	0	12	24	36	52
Pseudomonas spp	33,3	16,6	---	---	---
Enterobacteriaceae	22,2	20,8	---	---	---
Micrococcus spp	13,6	---	---	---	---
Levedura	5,7	4,3	---	---	---
Acinetobacter spp	5,7	---	---	---	---
Staphylococcus spp	11,1	---	---	---	---
Streptococcus spp	3,6	---	---	---	---
Lactobacillus spp	5,8	58,3	100,0	100,0	100,0
Total de isolados	36	24	36	36	36

1- Expressa em porcentagem dos microrganismos isolados por período, independente do tratamento utilizado.

Observa-se na tabela anterior que a partir do 24º até o 52º dia de armazenamento, todas as culturas isoladas foram identificadas como *Lactobacillus* spp. Neste experimento a microbiota inicialmente apresentou uma maior diversidade e no decorrer do período de estocagem tornou-se essencialmente compreendida por *Lactobacillus* spp. O predomínio de *Lactobacillus* ocorreu a partir do 12º dia de armazenamento. Estes resultados são bastante coincidentes com os relatados por diversos autores, JAYE et alii (1962), PIERSON et alii (1970) e SEIDMAN et alii (1976b) verificaram que a predominância de bactérias lácticas ocorre a partir do 8º dia de armazenamento. Já KENNEDY Jr. et alii (1982) só observaram esta predominância nas amostras armazenadas no período de 28-42 dias.

KEETON et alii (1988) encontraram, dentro da distribuição da flora psicrotrófica, ao zero dia de armazenamento de carne bovina embalada a vácuo, uma maior diversidade de população nas amostras adicionadas de DFG. Aos 49 dias de estocagem a população era compreendida de 99,9% de *Lactobacillus celobiosus* e 0,1% de *Hafnia alvei* para as amostras adicionadas de DFG e para as amostras controle 88,1% de *Lactobacillus plantarum* e 11,9% de *Hafnia alvei*. KENNEDY Jr. et alii (1982) também trabalhando com carne bovina embalada a vácuo, encontraram dentro da população psicrotrófica uma proporção de 12% de levedura ao zero dia de estocagem e entre 14 e 21 dias, 10%.

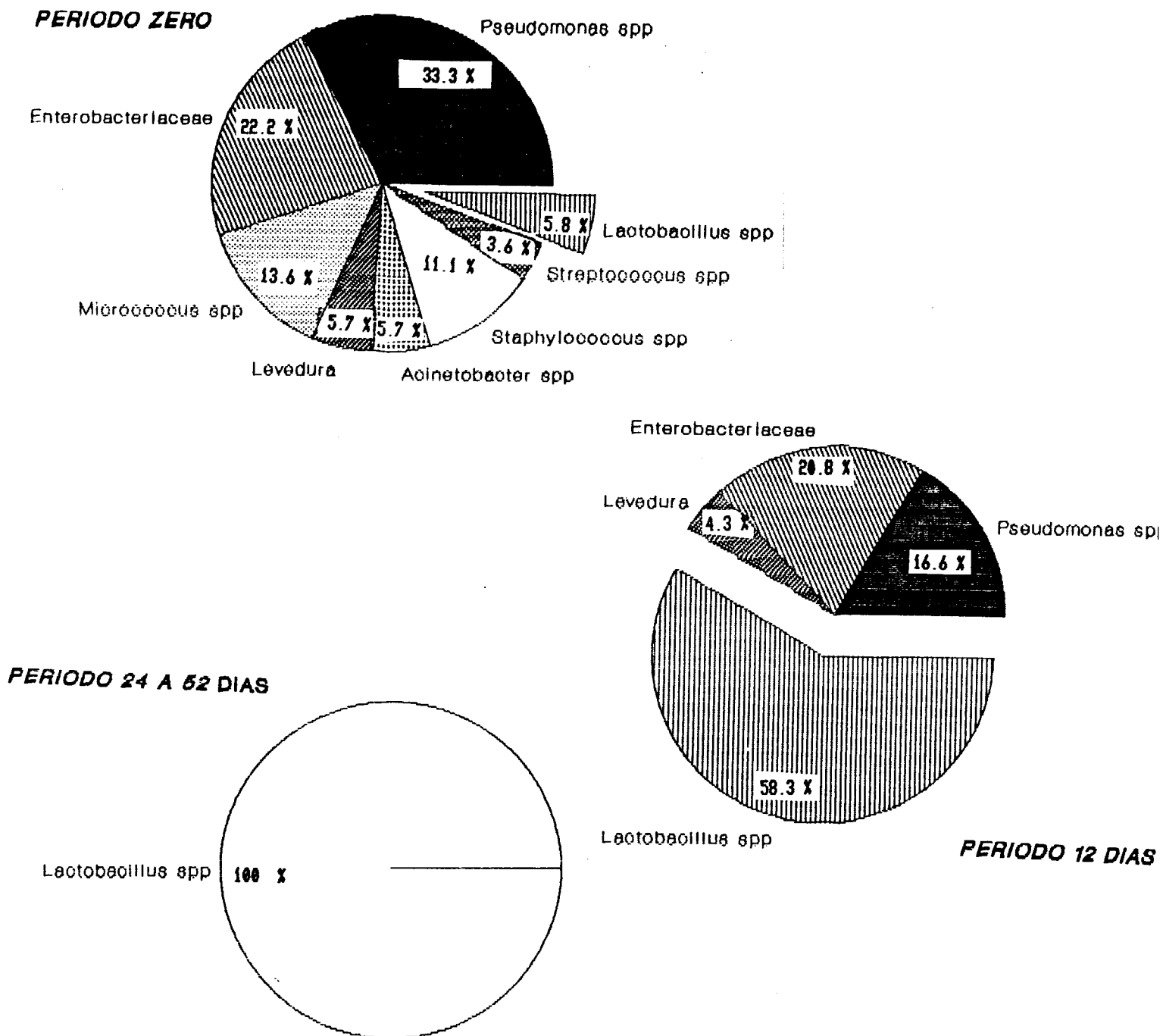


FIGURA 10 - PORCENTAGEM RELATIVA DA MICROBIOTA PSICOTRÓFICA EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO DURANTE 5 PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO (0, 12, 24, 36 e 52 DIAS).

**TABELA 10 - PERFIL DA MICROBIOTA PSICROTÓFICA EM CONTRAFILÉ IMEDIATAMENTE
APÓS A EMBALAGEM A VÁCUO (ZERO DIA DE ARMAZENAMENTO)**

ISOLADO Nº (tratamentos 1)	morfo logia	Gram	Oxi.	Cresc. MC	O/F	NH ₃ Arg	Pig.	Flag.	Esp.	Cata- lase	Identificação presuntiva
14-1(A)	B	-	-	+	F	-	-	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
14-2(A)	C	+	+	-	F	NE	NE	NE	NE	+	Micrococcus
14-3(A)	B	-	-	-	O	-	-	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
49-1(A)	B	-	+	+	F	-	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
49-2(A)	B	-	+	+	NR	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
49-3(A)	L	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	Levedura
40-1(A)	C	+	NE	-	F	NE	NE	NE	NE	+	Staphylococcus
40-2(A)	B	-	-	+	F	NE	-	-	NE	NE	Acinetobacter
40-3(A)	C	+	NE	-	O	NE	-	NE	NE	+	Staphylococcus
32-1(B)	B	+	NE	-	O	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
32-2(B)	B	-	-	+	F	-	-	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
32-3(B)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
84-1(B)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
84-2(B)	B	-	-	+	F	-	-	-	NE	NE	Enterobacteriaceae
84-3(B)	B	-	-	+	NR	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
21-1(B)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
21-2(B)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
21-3(B)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
63-1(C)	C	+	NE	-	O	NE	-	NE	NE	+	Micrococcus
63-2(C)	B	-	-	+	F	-	-	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
63-3(C)	B	-	-	+	NR	NE	-	NE	NE	NE	Acinetobacter
17-1(C)	B	-	-	+	F	-	-	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
17-2(C)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
17-3(C)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
41-1(C)	B	-	-	+	F	-	-	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
41-2(C)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
41-3(C)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
82-1(D)	C	+	NE	-	F	NE	-	NE	NE	+	Staphylococcus
82-2(D)	B	-	-	+	F	-	-	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
82-3(D)	C	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	NE	-	Streptococcus
04-1(D)	C	+	+	-	O	NE	NE	NE	NE	+	Micrococcus
04-2(D)	C	+	+	-	O	NE	NE	NE	NE	+	Micrococcus
04-3(D)	C	+	NE	-	F	NE	NE	NE	NE	+	Staphylococcus
39-1(D)	C	+	+	-	O	NE	NE	NE	NE	+	Micrococcus
39-2(D)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
39-3(D)	L	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	Levedura

+: POSITIVO O. OXIDATIVO B. BASTONETES
 -: NEGATIVO F. FERMENTATIVO C. COCOS
 NR. NÃO REATIVO L. LEVEDURA
 1. LETRAS ENTRE PARÊNTESES INDICAM O TRATAMENTO QUE O ISOLADO PERTENCE
 Oxi. REAÇÃO DE OXIDASE Esp. PRESENÇA DE ESPOROS
 Cresc. MC. CRESCIMENTO EM AGAR MAC CONKEY Catalase REAÇÃO DE CATALASE
 O/F: METABOLISMO OXIDATIVO/ FERMENTATIVO
 NH₃ Arg. ARGININA DEIDROLASE Flag. PRESENÇA DE FLAGELO
 Pig. PIGMENTAÇÃO AMARELA NE. TESTE NÃO EXECUTADO

**TABELA 11- PERFIL DA MICROBIOTA PSICROTÓFICA EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO
APÓS 12 DIAS DE ARMAZENAMENTO**

ISOLADO Nº (tratamento ⁵¹)	morfo- logia	Gram	Oxi.	Cresc. MC	O/F	NH ₃ Arg	Pig.	Flag.	Esp.	Cata- lase	Identificação presuntiva
57-1 (A)	B	-	-	+	F	NE	NE	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
57-2 (A)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
57-3 (A)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
77-1 (A)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
77-2 (A)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
77-3 (A)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
71* (A)											
73-1 (B)	B	-	-	+	F	NE	NE	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
73-2 (B)	B	-	-	+	F	NE	NE	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
73-3 (B)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
60-1 (B)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
60-2 (B)	L		NE		NE	NE	NE	NE	NE	NE	Levedura
60-3 (B)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
69-1 (B)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
69-2 (B)											Perdida
69-3 (B)											Perdida
05-1 (C)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
05-2 (C)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
05-3 (C)	B	+	NE	-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
65-1 (C)	B	-	+	+	O	+	-	NE	NE	NE	Pseudomonas
65-2 (C)	B	+		-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
65-3 (C)	B	+		-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
70* (C)											
02* (D)											
35-1 (D)	B	+		-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
35-2 (D)	B	-	-	+	F	NE	NE	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
35-3 (D)	B	+		-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus
55-1 (D)	B	-	-	+	F	NE	NE	NE	NE	NE	Enterobacteriaceae
55-2 (D)	B	+		-	NE	NE	NE	NE	-	-	Lactobacillus

+	POSITIVO	O.	OXIDATIVO	B	BASTONETES
-	NEGATIVO	F	FERMENTATIVO	C	COCOS
NR.	NÃO REATIVO			L	LEVEDURA

Oxi:	REACÇÃO DE OXIDASE	Esp.	PRESENÇA DE ESPOROS
Cresc. MC	CRESCIMENTO EM AGAR MAC CONKEY	Catalase:	REACÇÃO DE CATALASE
O/F:	METABOLISMO OXIDATIVO/ FERMENTATIVO		
NH ₃ Arg	ARGININA DEIDROLASE	Flag.	PRESENÇA DE FLAGELO
Pig	PIGMENTAÇÃO AMARELA	NE	TESTE NÃO EXECUTADO

* Amostras ausentes - Ausência de crescimento de colônias

1. LETRAS ENTRE PARÊNTESES INDICAM O TRATAMENTO QUE O ISOLADO PERTENCE

**TABELA 12 - PERFIL DA MICROBIOTA PSICROTÓFICA EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO
APÓS 24 DIAS DE ARMAZENAMENTO**

ISOLADO Nº (tratamento ¹)	morfo logia	Gram	Cresc. Esp. MC	Catalase	Identificação presuntiva
09-1(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
09-2(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
09-3(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
01-1(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
01-2(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
01-3(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
10-1(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
10-2(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
10-3(A)	B	+	-	-	Lactobacillus
06-1(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
06-2(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
06-3(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
53-1(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
53-2(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
53-3(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
12-1(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
12-2(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
12-3(B)	B	+	-	-	Lactobacillus
34-1(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
34-2(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
34-3(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
42-1(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
42-2(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
42-3(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
31-1(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
31-2(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
31-3(C)	B	+	-	-	Lactobacillus
15-1(D)	B	+	-	-	Lactobacillus
15-2(D)	B	+	-	-	Lactobacillus
15-3(D)	B	+	-	-	Lactobacillus
59-1(D)	B	+	-	-	Lactobacillus
59-2(D)	B	+	-	-	Lactobacillus
59-3(D)	B	+	-	-	Lactobacillus
79-1(D)	B	+	-	-	Lactobacillus
79-2(D)	B	+	-	-	Lactobacillus
79-3(D)	B	+	-	-	Lactobacillus

+ POSITIVO B. BASTONETE

- NEGATIVO

Oxi. REACÇÃO DE OXIDASE

Cresc. MC. CRESCIMENTO EM AGAR M'C CONKEY

Esp. PRESENÇA DE ESPOROS

Catalase. REACÇÃO DE CATALASE

**TABELA 13 - PERFIL DA MICROBIOTA PSICOTRÓFICA EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO
APÓS ARMAZENAMENTO POR 36 DIAS**

ISOLADO Nº (tratamento ¹)	morfo- logia	Gram	Oxi.	Cresc. MC	Esp.	Catalase	Identificação presuntiva
29-1(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
29-2(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
29-3(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
72-1(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
72-2(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
72-3(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
78-1(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
78-2(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
78-3(A)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
56-1(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
56-2(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
56-3(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
66-1(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
66-2(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
66-3(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
07-1(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
07-2(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
07-3(B)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
16-1(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
16-2(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
16-3(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
36-1(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
36-2(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
36-3(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
68-1(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
68-2(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
68-3(C)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
67-1(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
67-2(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
67-3(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
58-1(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
58-2(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
58-3(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
50-1(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
50-2(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus
50-3(D)	B	+	-	-	-	-	Lactobacillus

+ . POSITIVO B: BASTONETE
- . NEGATIVO

Cresc. MC CRESCIMENTO EM AGAR MAC CONKEY

Esp. PRESENÇA DE ESPOROS

Catalase: REAÇÃO DE CATALASE

1: LETRAS ENTRE PARÊNTESES INDICAM O TRATAMENTO QUE O ISOLADO PERTENCE

**TABELA 14 - PERFIL DA MICROBIOTA PSICOTRÓFICA EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO
APÓS 52 DIAS DE ARMAZENAMENTO**

ISOLADO Nº (tratamentos ¹)	morfo logia	Gram	Cresc. MC	Esp	Catalase	Identificação presuntiva
47-1(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
47-2(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
47-3(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
03-1(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
03-2(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
03-3(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
43-1(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
43-2(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
43-3(A)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
51-1(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
51-2(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
51-3(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
44-1(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
44-2(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
44-3(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
38-1(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
38-2(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
38-3(B)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
23-1(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
23-2(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
23-3(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
19-1(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
19-2(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
19-3(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
83-1(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
83-2(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
83-3(C)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
62-1(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
62-2(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
62-3(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
22-1(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
22-2(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
22-3(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
64-1(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
64-2(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus
64-3(D)	B	+	-	-	-	Lactobacillus

+ POSITIVO B. BASTONETE
- NEGATIVO

Cresc. MC. CRESCIMENTO EM AGAR MAC CONKEY

Esp. PRESENÇA DE ESPOROS

Catalase. REAÇÃO DE CATALASE

1. LETRAS ENTRE PARÊNTESES INDICAM O TRATAMENTO QUE O ISOLADO PERTENCE

5.1.3. DETERMINAÇÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VACUO

Nas tabelas seguintes são apresentados os resultados obtidos das determinações de microrganismos patogênicos, especificados no item 4.4.2.

A tabela 15 apresenta os resultados das contagens de Enterobactérias.

TABELA 15 - CONTAGEM¹ (LOG UFC/cm²) DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO (DIAS)	-----TRATAMENTOS ² -----				ORDEM DAS MÉDIAS ³
	A	B	C	D	
0	1,06 ^b	0,62 ^b	0,96 ^c	0,67 ^b	<u>A C D B</u>
12	4,69 ^a	3,47 ^a	3,52 ^{ab}	3,39 ^a	<u>A C B D</u>
24	2,93 ^{ab}	3,09 ^a	4,60 ^a	2,19 ^{ab}	<u>C B A D</u>
36	2,94 ^{ab}	2,88 ^a	4,45 ^a	2,82 ^{ab}	<u>C A B D</u>
44	1,81 ^b	2,66 ^{ab}	3,26 ^{ab}	2,02 ^{ab}	<u>C B D A</u>
52	2,39 ^b	2,49 ^{ab}	3,44 ^{ab}	2,59 ^{ab}	<u>C D B A</u>
60	2,31 ^b	1,93 ^{ab}	2,17 ^{bc}	0,77 ^b	<u>A C B D</u>

1- Média de 3 amostras por tratamento

2- A - "Barrier Bag"

B - "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D - "Bag Vac" + 2% DFG

a, b - Médias na mesma coluna, com a mesma letra não diferem (P>0,05)

3- Médias na mesma linha que possuem traço contínuo em comum não diferem (P>0,05)

Pode-se observar na tabela 15, que as maiores contagens ($\log$ ufc/cm²) foram obtidas no 12º dia para os tratamentos A, B e D ($\log$ UFC/cm² = 4,69; 3,47 e 3,39 respectivamente). Para o tratamento C a maior contagem obtida foi ao 24º dia (4,60 UFC/cm²). Houve diferenças significativas entre tratamentos nos períodos 12, 24, 36 e 44 dias. Aos 24 e 36 dias houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre C e D, sendo que este comportamento não foi observado para os outros dois tratamentos. Aos 44 dias houve diferença entre os tratamentos A e C, não se observando o mesmo para os dois outros. O tratamento A foi o que apresentou a maior contagem de todas as determinações no período de 12 dias. Neste experimento não se observou um comportamento regular de crescimento, como ocorreu nas determinações de aeróbios mesófilos e psicrotróficos. Esta grande variabilidade também foi relatada por KENNEDY Jr. et alii (1982), que trabalharam com carne bovina embalada a vácuo armazenada por 6 semanas a 10°C.

Apesar de não existir diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, nota-se que as médias para o tratamento com aplicação de DFG (B e D) apresentaram contagens numericamente menores que as do tratamento sem DFG (A e C).

Durante o período inicial de armazenamento, houve um aumento da população microbiana indicando que as Enterobacterias se adaptaram muito bem ao ambiente anaeróbio aumentando a população continuamente até os 12 dias de armazenagem. Após esse período houve um decréscimo marcante nas contagens de enterobactérias coincidindo com o aumento da população de bactérias lácticas. NEWTON & GILL (1978), comparando o crescimento competitivo entre En-

terobacter e Lactobacillus em carne sob condições anaeróbias estocada a 10°C indicaram que os Lactobacillus superam rapidamente as espécies competidoras, inibindo-as. Esses mesmos autores determinaram o tempo de geração de Enterobacter, Lactobacillus e B. thermosphacta, indicando que o valor de tempo de geração a 20°C foi de 55,7 horas para o primeiro enquanto que para Lactobacillus e B. thermosphacta foi de 8,4 e 33,8 horas respectivamente.

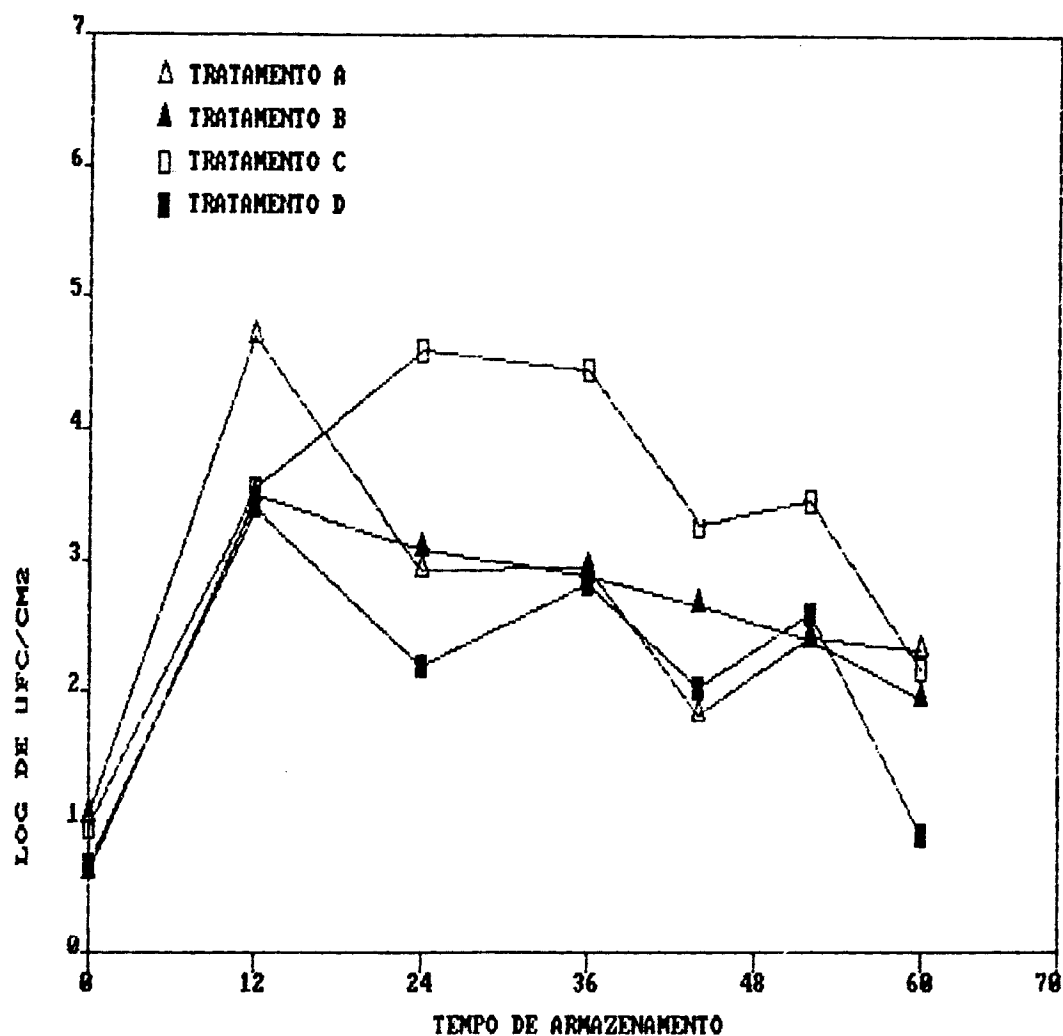


FIGURA 11 - CONTAGEM DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

Em relação à determinação de *Clostridium perfringens* foram detectadas contagens menores que $1,00 \log \text{ UFC/cm}^2$, não sofrendo, portanto, nenhuma alteração durante todos os períodos de armazenamento e em todos os tratamentos. No entanto, foram isoladas duas colônias das placas de diluição 10^{-1} das amostras de nº 21 e 84, pertencentes ao tratamento B, referentes ao período zero de armazenamento. Para estes isolados foram realizados testes de confirmação de *C. perfringens*, especificados em 4.4.2.1.A. Adicionalmente foi realizado o teste de produção de lecitinase e inibição de produção da mesma por antitoxina (reação de Nagler), que corrobora os resultados dos testes bioquímicos anteriores. A confirmação revelou que as cepas isoladas eram de *C. perfringens*. Nos períodos posteriores de armazenamento não foram isoladas cepas que se apresentassem como *C. perfringens*. Pode-se concluir que a incidência deste microrganismo foi baixa em todas as amostras examinadas, e o ambiente anaeróbio não estimulou o seu desenvolvimento, possivelmente devido à temperatura de estocagem. Ao contrário, NEWSOME et alli (1984), trabalhando com carne bovina embalada a vácuo e armazenada a 4°C durante 5 semanas, encontraram, dentre a microbiota mesófila, uma proporção de 3% de *C. perfringens* na 5ª semana. Porém a temperatura utilizada por estes pesquisadores foi mais alta do que aquela utilizada neste experimento.

Os resultados da determinação de coliformes totais e fecais, por período de armazenamento e amostras individuais, são apresentados na tabela 16 a 22, para cada período separadamente.

TABELA 16 - NMP¹ (por cm²) DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO(ZERO DIAS DE ARMAZENAMENTO

AMOSTRA Nº	TRATAMENTO	COLIFORMES TOTAIS	COLIFORMES FECAIS
14	A	4	4
49	A	23	9
40	A	4	4
32	B	9	4
84	B	7	7
21	B	43	43
63	C	< 3	< 3
17	C	< 3	< 3
41	C	93	9
82	D	23	< 3
04	D	< 3	< 3
39	D	< 3	< 3

1- Número Mais Provável

2- A - "Barrier Bag"

B - "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D - "Bag VAc" + 2% DFG

TABELA 17- NMP¹ (por cm²) DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM
CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO(12 DIAS DE ARMAZENAMENTO)

AMOSTRA Nº	TRATAMENTO	COLIFORMES TOTAIS	COLIFORMES FECAIS
57	A	1100	23
77	A	35	9
71	A	210	93
73	B	43	< 3
60	B	1100	23
69	B	93	23
05	C	240	< 3
65	C	1100	< 3
70	C	1100	23
02	D	< 3	< 3
55	D	< 3	< 3
35	D	460	< 3

1- Número Mais Provável

2- A -"Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C -"Bag Vac"

D- "Bag VAc" + 2% DFG

TABELA 18- NMP¹ (por cm²) DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM
CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO (24 DIAS DE ARMAZENAMENTO)

AMOSTRA Nº	TRATAMENTO	COLIFORMES TOTAIS	COLIFORMES FECAIS
09	A	750	< 30
01	A	40	< 30
10	A	11000	< 30
06	B	> 24000	< 30
53	B	70	40
12	B	230	< 30
34	C	> 24000	< 30
42	C	> 24000	< 30
31	C	2400	62
15	D	< 30	< 30
59	D	4600	< 30
79	D	< 30	< 30

1- Número Mais Provável

2- A - "Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D- "Bag VAc" + 2% DFG

TABELA 19 - NMP¹ (por cm²) DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM
CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO (36 DIAS DE ARMAZENAMENTO)

AMOSTRA Nº	TRATAMENTO ²	COLIFORMES TOTAIS	COLIFORMES FECAIS
29	A	230	< 30
72	A	90	< 30
78	A	230	< 30
56	B	230	< 30
66	B	430	< 30
07	B	90	< 30
16	C	230	< 30
36	C	210	< 30
68	C	< 30	< 30
67	D	< 30	< 30
58	D	< 30	< 30
50	D	90	< 30

1- Número Mais Provável

2- A - "Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D- "Bag VAc" + 2% DFG

TABELA 20 -NMP¹ (por cm²) DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM
CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO(44 DIAS DE ARMAZENAMENTO)

AMOSTRA Nº	TRATAMENTO ²	COLIFORMES TOTAIS	COLIFORMES FECAIS
30	A	4	< 3
48	A	> 2400	< 3
45	A	93	< 3
08	B	> 2400	23
20	B	290	< 3
11	B	93	< 3
54	C	240	< 3
76	C	1100	23
52	C	460	23
13	D	< 3	< 3
75	D	< 3	< 3
33	D	4	< 3

1- Número Mais Provável

2- A -"Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C -"Bag Vac"

D- "Bag VAc" + 2% DFG

TABELA 21 -NMP¹ (por cm²) DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM
CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO(52 DIAS DE ARMAZENAMENTO)

AMOSTRA Nº	TRATAMENTO ²	COLIFORMES TOTAIS	COLIFORMES FECAIS
47	A	23	4
03	A	> 2400	< 3
43	A	240	< 3
51	B	460	9
44	B	4	< 3
38	B	43	< 3
23	C	240	4
19	C	240	< 3
83	C	240	< 3
62	D	> 2400	< 3
22	D	43	< 3
64	D	23	4

1- Número Mais Provável

2- A -"Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C -"Bag Vac"

D- "Bag VAc" + 2% DFG

TABELA 22- NMP¹ (por cm²) DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS EM
CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO(60 DIAS DE ARMAZENAMENTO)

AMOSTRA Nº	TRATAMENTO ²	COLIFORMES TOTAIS	COLIFORMES FECAIS
46	A	4	< 3
37	A	240	< 3
24	A	< 3	< 3
74	B	93	< 3
26	B	240	23
28	B	4	4
27	C	4	< 3
18	C	43	< 3
25	C	< 3	< 3
81	D	< 3	< 3
61	D	93	< 3
80	D	23	< 3

1- Número Mais Provável

2- A -"Barrier Bag"

B- "Barrier Bag" + 2% DFG

C -"Bag Vac"

D- "Bag VAc" + 2% DFG

Observa-se que as maiores contagens de Coliformes totais e fecais foram obtidas no 24º dia de armazenamento, para todos os tratamentos sendo que o tratamento C registrou as contagens mais elevadas. Os coliformes fecais aumentaram a partir do 36º dia, enquanto que os totais não apresentaram um comportamento muito homogêneo.

Nossos resultados não confirmam os de KEETON et alii (1988) que observaram aumento na contagem de coliformes fecais durante o período de estocagem de 49 dias. Estes mesmos autores observaram que as contagens nas amostras que foram adicionadas de DFG foram numericamente bem mais baixas aos 35 e 49 dias do que as do controle e que aos 28 dias a contagem foi maior para as amostras com DFG.

TABELA 23 - CONTAGEM¹ (LOG UFC/cm²) DE *Staphylococcus aureus* EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO (DIAS)	TRATAMENTOS ²				ORDEM DAS MÉDIAS ³
	A	B	C	D	
0	0,75 ^a	1,43 ^a	1,57 ^a	1,12 ^a	<u>C B D A</u>
12	2,05 ^a	1,29 ^a	2,12 ^a	0,97 ^a	<u>C A B D</u>
24	1,26 ^a	1,43 ^a	1,60 ^a	1,36 ^a	<u>C B D A</u>
36	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	
44	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	
52	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	
60	<2,00	<2,00	<2,00	<2,00	

1- Média de 3 amostras por tratamento

2- A - "Barrier Bag"

B - "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D - "Bag Vac" + 2% DFG

a - Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem
($p > 0,05$)

3- Médias na mesma linha que possuem traço contínuo em comum não diferem ($P > 0,05$)

Os resultados da contagem de *Staphylococcus aureus* estão representados na tabela 23.

Não se observou diferença significativa ($P > 0,05$) entre tratamentos por período, nem entre períodos dentro de um mesmo tratamento. As cepas isoladas das placas de contagem foram submetidas aos testes confirmativos especificados no item 4.4.2.1 F.

Das 55 cepas isoladas, 48 cepas apresentaram a característica de produção de coagulase e DNase termo-resistente, confirmando sua patogenicidade.

A partir do 36º dia de armazenamento não se isolaram colônias características de *S. aureus*, mesmo na menor diluição. Verificou-se que o tempo de armazenamento bem como a utilização do monoglicerídeo acetilado (DFG) não apresentaram efeito sobre a proliferação deste microrganismo.

Podemos supor que, diante dos resultados obtidos no nosso experimento, a baixa temperatura aliada à presença de ácido láctico podem ter sido um dos fatores que contribuíram para o não desenvolvimento de *S. aureus*. KENNEDY et alii (1980) obtiveram um declínio na contagem de *S. aureus* durante os primeiros sete dias de estocagem a 1,7°C, seguindo de um constante decréscimo na recuperação aos 21 dias e um declínio marcante durante a última semana (28 dias). De acordo com os autores, este declínio foi resultado de injúria letal ou sub-letal das células, devido à estocagem sob baixas temperaturas. Os autores concluíram que a embalagem a vácuo não proporciona um ambiente mais favorável do que a embalagem em condições aeróbias para a sobrevivência de patógenos facultativos como *S. aureus*, durante o armazenamento prolongado sob refrigeração.

Portanto, podemos supor que um abuso de temperatura durante o armazenamento, a carne bovina embalada a vácuo pode se tornar um alimento de risco à saúde.

Quanto a determinação de *Salmonella*, foi verificada a ausência deste microrganismo nas 84 amostras analisadas. Este resultado está de acordo com a legislação brasileira, que exige ausência deste patógeno em 25g de produto. DAVIDSON & WITHEY (1974) estudando carne moída embalada a vácuo e inoculada com *Salmonella* observaram um aumento de 4 ciclos log/g, após uma semana a 12°C. Porém estas condições são abusivas, diferentes daquelas estudadas neste experimento.

5.1.4. IDENTIFICAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS

De acordo com o proposto em 4.4.2.1 item b, foi realizada a identificação das enterobacterias e os resultados são apresentados na tabela 24, podendo ser visualizados nas figuras 12, 13 e 14.

TABELA 24 - DISTRIBUIÇÃO¹ DA MICROBIOTA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

MICRORGANISMO	PERÍODOS						
	0	12	24	36	44	52	60
<i>Hafnia alvei</i>	10,5	8,3	13,7	12,5	17,6	5,9	11,1
<i>Enterobacter</i> spp	26,3	44,4	24,1	15,6	11,8	20,6	27,8
<i>Escherichia</i> spp	15,8	2,8	--	--	--	--	2,8
<i>Morganella morganii</i>	--	--	3,5	--	--	--	--
<i>Proteus</i> spp	--	2,8	3,5	--	--	--	--
<i>Serratia</i> spp	47,4	41,7	55,2	71,9	70,6	73,5	58,3

1- Expressa em porcentagem dos microrganismos isolados por período, independente do tratamento utilizado.

Pode-se observar que houve predominância de *Serratia* spp em todos os períodos de armazenagem, exceto aos 12 dias. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por AHMAD & MARCHELLO (1989). Já GRAU (1978) observou a predominância de *Enterobacter* spp, entre as enterobactérias, na 7ª semana de estocagem. KENNEDY et alii (1982) observaram que a porcentagem de *Serratia* spp era de 22% da população de enterobactérias entre 28 e 42 dias de armazenagem. Em nosso caso *Serratia* spp atingiu porcentagem de 55 a 73,5 % entre 24 e 44 dias de estocagem.

Não se detectou a presença de *Escherichia* spp nos períodos de 24, 36, 44 e 52 dias. KENNEDY et alii (1980) e HANNA et alii (1979) detectaram um aumento significativo de *Hafnia* alvei dentre as enterobactérias durante a estocagem de carne embalada a vácuo. Neste experimento foi observada apenas uma flutuação da porcentagem entre 10,5 a 13,7 % da população isolada deste microrganismo não havendo, portanto, um aumento deste durante o armazenamento.

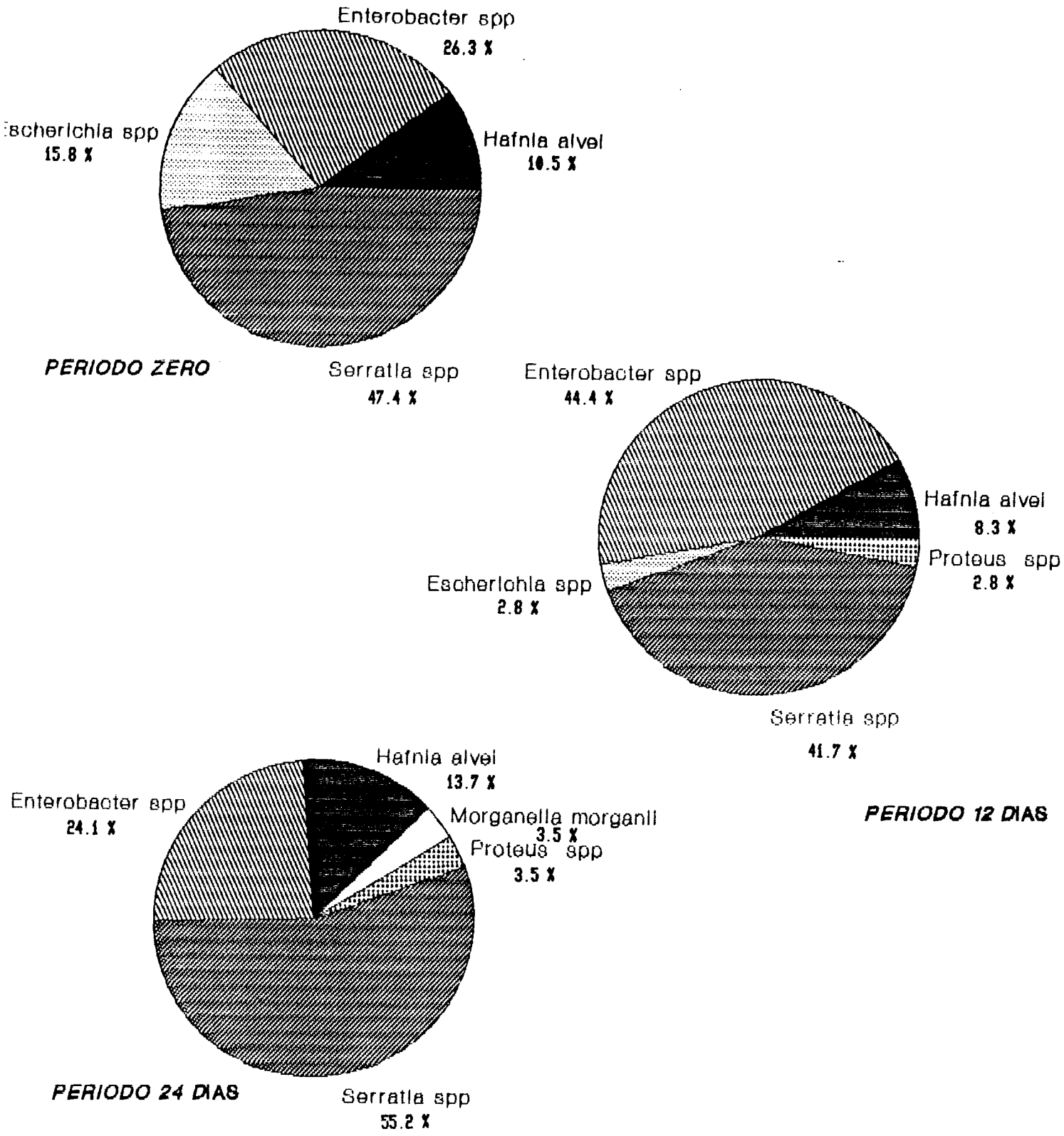
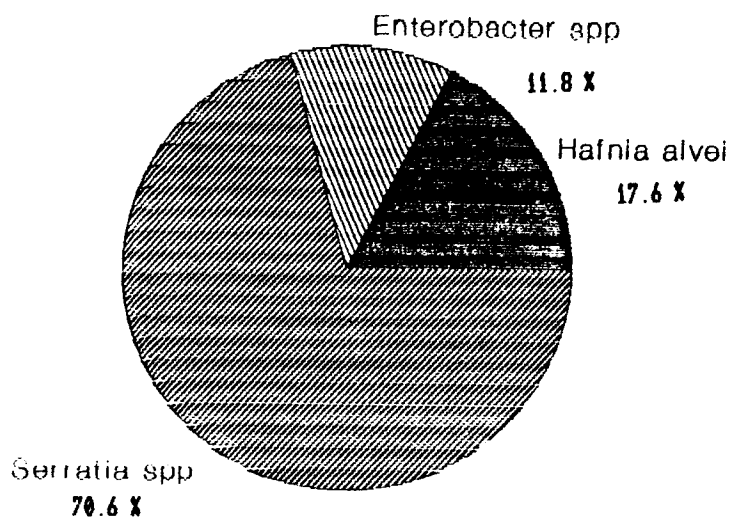
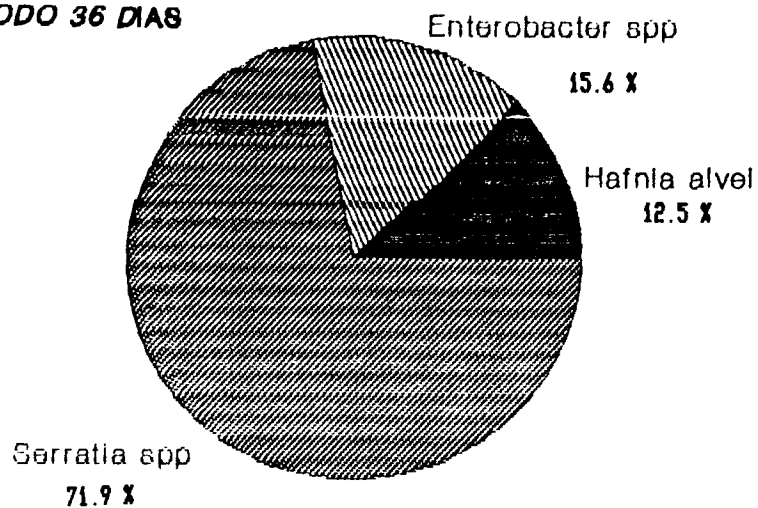


FIGURA 12 - PORCENTAGEM RELATIVA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO DURANTE TRÊS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO (ZERO, 12 E 24 DIAS)

PERIODO 36 DIAS



PERIODO 44 DIAS

PERIODO 52 DIAS

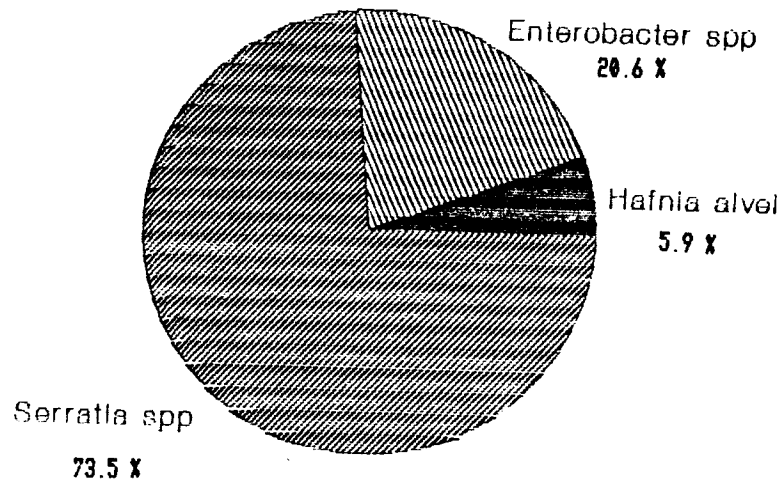


FIGURA 13 - PORCENTAGEM RELATIVA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO DURANTE TRÊS PERÍODOS DE ARMAZENAMENTO (36,44 E 52 DIAS)

PERIODO 60 DIAS

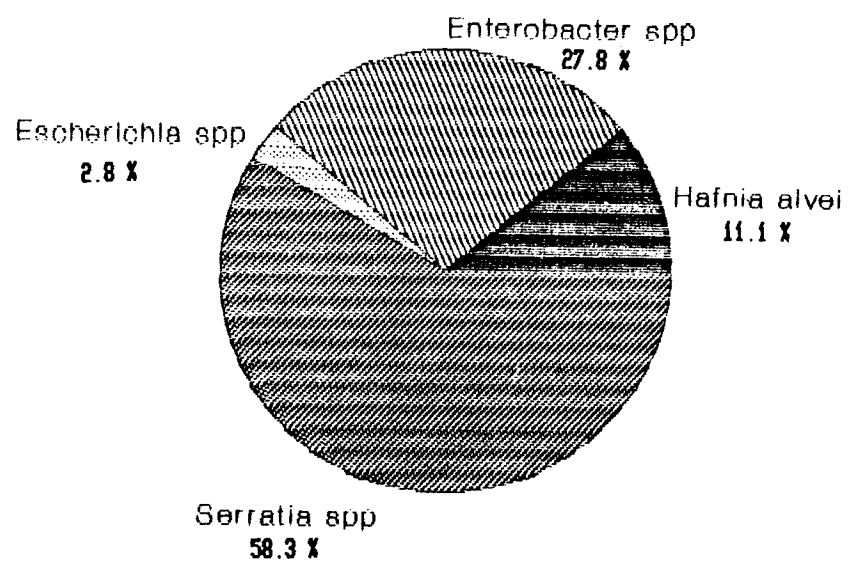


FIGURA 14 - PORCENTAGEM RELATIVA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO DURANTE 60 DIAS DE ARMAZENAMENTO.

TABELA 25 - PERFIL DA MICROBIOTA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ
IMEDIATAMENTE APÓS EMBALAGEM À VÁCUO (ZERO DIAS DE ARMAZENAMENTO)

ISOLADO		(TSI)	GEL										PROD. GAS	IDENTIFICAÇÃO
Nº	TRAT	PHE	H2S	22oC	VM	VP	LIS	CIT	URE	MOT	IND	DNase	SACAROSE	PRESUNTIVA
14 *	A													
49-1	A	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	NE	Escherichia
49-2	A	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	NE	Escherichia
49-3	A	-	-	+	+	+	+	+			-	+	NE	Serratia
40 *	A													
32-1	B	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	NE	Escherichia
32-2	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
32-3	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
84-1	B	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Hafnia alvei
84-2	B	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
84-3	B	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
21-1	B	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
21-2	B	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	NE	Serratia
21-3	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
63 *	C												NE	
17-1 *	C													
17-2	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
17-3 *	C												NE	
41-1	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
41-2	C	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
41-3	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
82-1	D	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
82-2	D	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
82-3	D	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Hafnia alvei
04 *	D													
39 *	D													

TRAT = A - "BARRIER BAG" * Amostras que não apresentaram crescimento
 B - "BARRIER BAG" + 2% DFG NE - TESTE NÃO EXECUTADO
 C - "BAG VAC"
 D - "BAG VAC" + 2% DFG

PHE = FENILALANINA DEAMINASE CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO
 H₂S = PRODUÇÃO EM TSI URE = UREASE
 GEL = GELATINASE A 22°C MOT = MOTILIDADE
 VM = TESTE DE VERMELHO DE METILA IND = INDOL
 VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER DNase = PRODUÇÃO A 25°C
 LIS = LISINA DECARBOXILASE GÁS DE SACAROSE = PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

TABELA 26 - PERFIL DA MICROBIOTA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ
 EMBALADO A VÁCUO APÓS 12 DIAS DE ARMAZENAMENTO.

ISOLADO Nº	TRAT	PHE	GEL			VP	LIS	CIT	URE	MOT	IND	DNase	PROD. GAS SACAROSE	IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA
			H2S	22oC	VH									
57-1	A	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
57-2	A	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
57-3	A	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
77-1	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
77-2	A	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
77-3	A	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	NE	Escherichia
71-1	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
71-2	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
71-3	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
73-1	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
73-2	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
73-3	B	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	NE	Serratia fonticola
60-1	B	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
60-2	B	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	NE	Serratia fonticola
60-3	B	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
69-1	B	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
69-2	B	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
69-3	B	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
05-1	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
05-2	C	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	NE	Proteus
05-3	C	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
65-1	C	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
65-2	C	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
65-3	C	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
70-1	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
70-2	C	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
70-3	C	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
02-1	D	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
02-2	D	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
02-3	D	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
55-1	D	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
55-2	D	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
55-3	D	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
35-1	D	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	NE	Serratia fonticola
35-2	D	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
35-3	D	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter

TRAT = A - "BARRIER BAG" NE - TESTE NAO EXECUTADO
 B - "BARRIER BAG" + 2X DFG
 C - "BAG VAC"
 D - "BAG VAC" + 2X DFG

PHE = FENILALANINA DEAMINASE CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO
 H2S = PRODUÇÃO EM TSI URE = UREASE
 GEL = GELATINASE A 22oC MOT = MOTILIDADE
 VH = TESTE DE VERMELHO DE METILA IND = INDOL
 VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER DNase = PRODUÇÃO A 25oC
 LIS = LYSINA DESCARBOXILASE GAS DE SACAROSE - PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

TABELA 27 - PERFIL DA MICROBIOTA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO APÓS 24 DIAS DE ARMAZENAMENTO.

ISOLADO				GEL									PROD. GAS	IDENTIFICAÇÃO
Nº	TRAT	PHE	H ₂ S	22oC	VM	VP	LIS	CIT	URE	MOT	IND	DNase	SACAROSE	PRESUNTIVA
09-1	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
09-2	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
09-3	A													AMOSTRA PERDIDA
01-1	A	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia fonticola
01-2	A	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
01-3	A	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
10-1	A	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
10-2	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
10-3	A	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
06-1	B	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
06-2	B	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
06-3	B	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia fonticola
53 *	B													
12-1	B	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
12-2	B	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
12-3	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
34-1	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
34-2	C	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+		NE	Morganella
34-3	C	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
42-1	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-		NE	Proteus
42-2	C	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
42-3	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
31-1	C	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	NE	Serratia
31-2	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
31-3	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
15-1	D	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
15-2	D	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
59-1	D	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
59-2	D	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia fonticola
59-3	D	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
79-1	D	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia

TRAT = A - "BARRIER BAG" * Amostra 53 não apresentou crescimento
 B - "BARRIER BAG" + 2% DFG NE - TESTE NAO EXECUTADO
 C - "BAG VAC"
 D - "BAG VAC" + 2% DFG

PHE = FENILALANINA DEAMINASE CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO
 H₂S = PRODUÇÃO EM TSI URE = UREASE
 GEL = GELATINASE A 22oC MOT = MOTILIDADE
 VM = TESTE DE VERMELHO DE METILA IND = INDOL
 VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER DNase = PRODUÇÃO A 25oC
 LIS = LISINA DESCARBOXILASE GÁS DE SACAROSE = PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

TABELA 28 - PERFIL DA MICROBIOTA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ
EMBALADO A VÁCUO APÓS 36 DIAS DE ARMAZENAMENTO.

ISOLADO				GEL									PROD. GAS	IDENTIFICAÇÃO
Nº.	TRAT	PHE	H2S	22oC	VM	VP	LIS	CIT	URE	MOT	IND	DNase	SACAROSE	PRESUNTIVA
29-1	A	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
29-2	A	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
29-3	A	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
72-1	A	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
72-2	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
72-3	A	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	NE	Serratia
78-1	A	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
78-2	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
78-3	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
56-1	B	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
56-2	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
56-3	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
66-1	B	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
66-2	B	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
66-3	B	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
07-1	B	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
07-2	B	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
07-3	B	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
16-1	C	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
16-2	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
16-3	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
36-1	C	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
36-2	C	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	NE	Serratia fonticola
36-3	C	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	NE	Enterobacter
68-1	C	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
68-2	C	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
68-3	C	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
67-1	D	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	NE	Serratia fonticola
67-2	D	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
58-*	D													
50-1	D	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
50-2	D	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
50-3	D	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	Serratia

TRAT = A - "BARRIER BAG"

B - "BARRIER BAG" + 2% DFG

C - "BAG VAC"

D - "BAG VAC" + 2% DFG

* Amostra 58 não apresentou crescimento

NE - TESTE NÃO EXECUTADO

PHE = FENILALANINA DEAMINASE

H2S = PRODUÇÃO EM TSI

GEL = GELATINASE A 22oC

VM = TESTE DE VERMELHO DE METILA

VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER

LIS = LISINA DESCARBOXILASE

CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO

URE = UREASE

MOT = MOTILIDADE

IND = INDOL

DNase = PRODUÇÃO A 25oC

GÁS DE SACAROSE = PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

TABELA 29 - PERFIL DA MICROBIOTA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ
EMBALADO A VÁCUO APÓS 44 DIAS DE ARMAZENAMENTO.

ISOLADO	Nº	TRAT	GEL										PROD. GAS	IDENTIFICAÇÃO
			PHE	H2S	22oC	VH	VP	LIS	CIT	URE	MOT	IND	DNase	SACAROSE
30-1	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
30-2	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
48-1	A	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
48-2	A	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
48-3	A	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
45-1	A	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
45-2	A	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
45-3	A	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
08-1	B	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
08-2	B	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
08-3	B	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	NE	Serratia fonticola
20-1	B	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	NE	Serratia fonticola
20-2	B	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
20-3	B	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
11-1	B	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
11-2	B	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
11-3	B	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
54-1	C	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
54-2	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
54-3	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
76-1	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	Enterobacter
76-2	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
76-3	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
52-1	C	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
52-2	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
52-3	C	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
13-1	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
13-2	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
13-3	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	Serratia
75-1	D	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
75-2	D	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
75-3	D	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
33-1	D	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
33-2	D	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	NE	Serratia
33-3*	D													

TRAT = A - "BARRIER BAG" * Amostra 33-3 foi perdida
 B - "BARRIER BAG" + 2X DFG NE - TESTE NAO EXECUTADO
 C - "BAG VAC"
 D - "BAG VAC" + 2X DFG

PHE = FENILALANINA DEAMINASE CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO
 H2S = PRODUÇÃO EM TSI URE = UREASE
 GEL = GELATINASE A 22oC MOT = MOTILIDADE
 VH = TESTE DE VERMELHO DE METILA IND = INDOL
 VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER DNase = PRODUÇÃO A 25oC
 LIS = LISINA DESCARBOXILASE GAS DE SACAROSE = PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

TABELA 30 - PERFIL DA MICROBIOTA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO APÓS 52 DIAS DE ARMAZENAMENTO.

No. da amostra	TRAT	PHE	GEL			VP	LIS	CIT	URE	MOT	IND	DNase	PROD SACAROSE	GAS	IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA
			H ₂ S	22oC	VM										
47-1	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
47-2	A	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	Hafnia alvei
47-3	A	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	NE	-	Enterobacter
03-1	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
03-2	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
03-3	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
43-1	A	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	NE	-	Serratia fonticola
43-2	A	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
43-3	A	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	NE	-	Serratia fonticola
51-1	B	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
51-2	B	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
51-3	B	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
44-1	B	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
38-1	B	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	Hafnia alvei
38-2	B	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
38-3	B	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
23-1	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	NE	-	Enterobacter
23-2	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
23-3	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
19-1	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	-	Enterobacter
19-2	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
19-3	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
83-1	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
83-2	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
83-3	C	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	-	Enterobacter
62-1	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
62-2	D	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	NE	-	Enterobacter
62-3	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
22-1	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
22-2	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
22-3	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
64-1	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	NE	-	Serratia
64-2	D	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	NE	-	Enterobacter
64-3	D	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	NE	-	Enterobacter

TRAT = A - "BARRIER BAG"

B - "BARRIER BAG" + 2% DFG

C - "BAG VAC"

D - "BAG VAC" + 2% DFG

NE - TESTE NAO EXECUTADO

PHE = FENILALANINA DEAMINASE

GEL = GELATINASE A 22oC

VM = TESTE DE VERMELHO DE METILA

VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER

LIS = LISINA DESCARBOXILASE

CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO

MOT = MOTILIDADE

IND = INDOL

DNase = PRODUÇÃO A 25oC

GÁS DE SACAROSE = PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

TABELA 31 - PERFIL DA MICROBIOTA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO APÓS 60 DIAS DE ARMAZENAMENTO.

ISOLADO Nº	TRAT	GEL										PROD. GAS SACAROSE	IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA
		PHE	H2S	22oC	VM	VP	LIS	CIT	URE	KOT	IND	DNase	
46-1	A	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	Enterobacter
46-2	A	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	Enterobacter
46-3	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
37-1	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
37-2	A	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	Hafnia alvei
37-3	A	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	Escherichia
24-1	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
24-2	A	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Serratia fonticola
24-3	A	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
74-1	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
74-2	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
74-3	B	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
26-1	B	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	Hafnia alvei
26-2	B	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	Serratia fonticola
26-3	B	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	Serratia
28-1	B	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Serratia fonticola
28-2	B	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Serratia fonticola
28-3	B	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Serratia fonticola
27-1	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	Enterobacter
27-2	C	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	Enterobacter
27-3	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	Serratia
18-1	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	Enterobacter
18-2	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	Enterobacter
18-3	C	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	Serratia fonticola
25-1	C	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	Enterobacter
25-2	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	Serratia
25-3	C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	Serratia
81-1	D	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	Enterobacter
81-2	D	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	Enterobacter
81-3	D	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	Serratia
61-1	D	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
61-2	D	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	Hafnia alvei
61-3	D	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	Enterobacter
80-1	D	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
80-2	D	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	Serratia
80-3	D	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	Hafnia alvei

TRAT = A - "BARRIER BAG"

B - "BARRIER BAG" + 2% DFG

C - "BAG VAC"

D - "BAG VAC" + 2% DFG

NE - TESTE NAO EXECUTADO

PHE = FENILALANINA DEAMINASE

H2S = PRODUÇÃO EM TSI

GEL = GELATINASE A 22oC

VM = TESTE DE VERMELHO DE METILA

VP = TESTE DE VOGES PROSKAUER

LIS = LISINA DECARBOXILASE

CIT = UTILIZAÇÃO DE CITRATO

URE = UREASE

KOT = MOTILIDADE

IND = INDOL

DNase = PRODUÇÃO A 25oC

GAS DE SACAROSE = PRODUÇÃO A PARTIR DE SACAROSE

5.1.5. DETERMINAÇÃO DE *Yersinia enterocolitica*

Na tabela 32 são apresentados os números de cepas isoladas de *Yersinia* spp, de acordo com o especificado em 4.4.2.1. item E.

TABELA 32 - NÚMERO DE CEPAS ISOLADAS DE *Yersinia* spp em CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO	TRATAMENTO ¹			
	A	B	C	D
0	--	--	--	--
12	1	1	--	--
24	2	--	1	--
36	1	--	6	2
44	1	9	4	--
52	3	7	5	3
60	3	5	5	--
TOTAL	11	22	21	5

1- A - "Barrier Bag"

B - "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D - "Bag Vac" + 2% DFG

No período zero de armazenamento não foram encontradas colônias com características de *Yersinia* spp.

O maior número de isolados de *Yersinia* spp foi encontrado no tratamento B. Houve um aumento do número de isolados com o avanço do tempo de armazenamento, sugerindo que a estocagem possa favorecer o crescimento deste microrganismo, independentemente do tipo de tratamento utilizado. É fato conhecido que a *Yersinia* spp tolera bem as baixas temperaturas (3º C). Neste experimento não foram encontradas cepas de *Yersinia enterocolitica*. Contudo encontrou-se *Y. intermedia* e *Y. kristensenii*, sendo que o número de cepas isoladas destas espécies estão apresentados na tabela 33.

HANNA et alii (1976) não isolaram *Y. enterocolitica* nas amostras armazenadas entre zero, 7 e 14 dias. De acordo com estes autores, entretanto, as amostras se apresentaram positivas aos 21 (1 amostra), 28 (7 amostras) e 35 dias (2 amostras), num total de 10 amostras para este microrganismo.

TABELA 33 - ESPÉCIES¹ DE *Yersinia* spp IDENTIFICADAS EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO.

PERÍODO	TRATAMENTO ²	ESPÉCIE	
		<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. kristensenii</i>
ZERO	A	--	--
	B	--	--
	C	--	--
	D	--	--
12	A	1	--
	B	1	--
	C	--	--
	D	--	--
24	A	2	--
	B	--	--
	C	1	--
	D	--	--
36	A	--	1
	B	--	--
	C	6	--
	D	2	--
44	A	1	--
	B	8	1
	C	3	1
	D	--	--
52	A	3	--
	B	4	3
	C	4	1
	D	1	2
60	A	2	1
	B	4	1
	C	5	--
	D	--	--

1- número de cepas isoladas

2- A - "Barrier Bag"

B - "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D - "Bag Vac" + 2% DFG

FEELEY & SCHIEMANN (1980) afirmaram que *Y. fredericksenii*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia* parecem pertencer ao ambiente e não são causadoras de doenças em seres humanos.

O isolamento destas espécies não possui um padrão consistente que se possa correlaciona-lo a utilização de monoglicérido acetilado

5.2. DETERMINAÇÃO DA PERDA DE PESO

A perda de peso foi determinada como especificado em 4.5.1. Os dados obtidos são apresentados na tabela 34, representam a média da porcentagem de perda de peso de três amostras por tratamento, em cada período. Os dados da tabela estão representados na figura 14.

TABELA 34 - PORCENTAGEM DA PERDA DE PESO EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO -----	TRATAMENTO ¹ -----				ORDEM DAS MÉDIAS ²
(DIAS)	A	B	C	D	
0	1,46c	0,34c	1,99c	0,79b	C A D B
12	3,02a	1,57bc	3,23bc	2,62ab	<u>C A D B</u>
24	4,19a	2,76ab	4,13ab	3,53a	<u>A C D B</u>
36	4,28a	2,83ab	4,94ab	3,35ab	<u>C A D B</u>
44	4,88a	3,27a	5,32a	3,97a	<u>C A D B</u>
52	4,25a	3,82a	5,02ab	4,89a	<u>C D A B</u>
60	4,42a	3,94a	5,99a	4,69a	<u>C D A B</u>

1- A - "Barrier Bag"

B - "Barrier Bag" + 2% DE DFG

C - "Bag Vac"

D - "Bag Vac" + 2% DE DFG

a,b,c - Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem

($p > 0,05$)

2 - Médias na mesma linha que possuam traço contínuo em comum não diferem ($p > 0,05$)

Houve diferença significativa a nível de 5 % nas médias de percentagem de perda de peso entre os tratamentos por período, nos dias 0 e 24 de armazenamento. A partir do 36º dia não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre tratamentos por período. Observou-se um aumento de perda de peso com o avanço dos dias de estocagem. Este fato corrobora os resultados encontrados por BOWLING et alli (1977), SEIDMAN et alli (1979), GRIFFINS et alli (1982), LIEBICH et alli (1986), KEETON et alli (1988).

Em todos os períodos as menores porcentagens de perda de peso foram observadas para o tratamento B. KEETON et alli (1988) observaram que a perda de peso tendeu a ser menor com DFG durante a estocagem, por 7 semanas e foi significativamente menor ($P < 0,05$) na 4 e 6ª semanas.

As maiores diferenças de perda de peso ocorreram entre os períodos 0 e 12º dias sendo estes valores de 1,23; 1,24; 1,56 e 1,83 para os tratamentos B, C, A e D respectivamente.

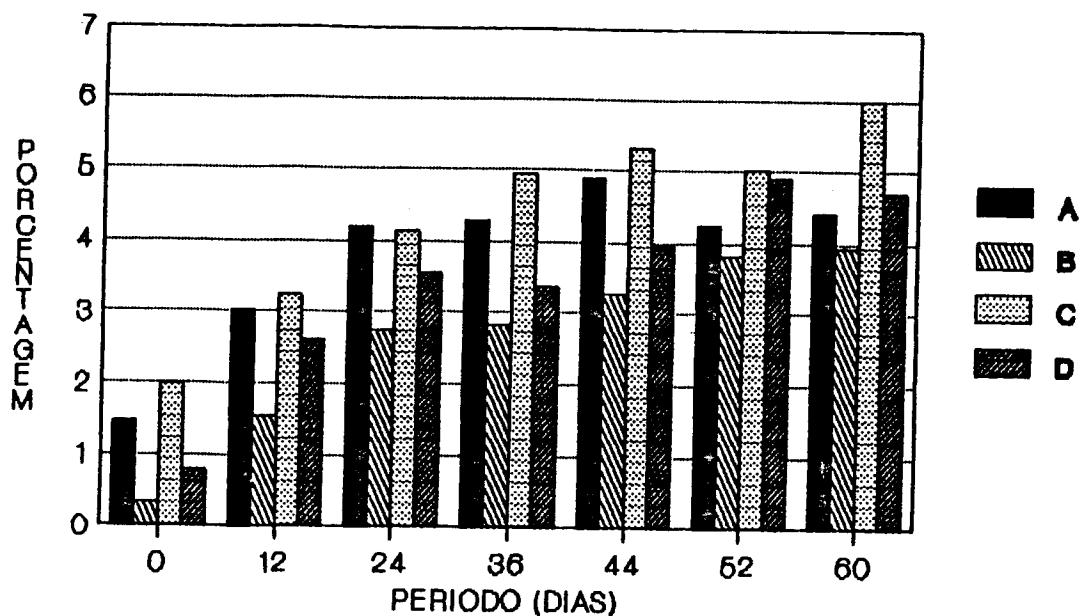
Comparando-se as médias de perda de peso entre os tratamentos nota-se que, em todos os períodos, a maior perda de peso foi observada entre as amostras que não foram adicionadas de DFG. Observou-se, portanto, que houve um efeito de diminuição da perda de peso pelo DFG, apesar dos resultados não apresentarem diferença estatística significativa.

A perda de peso máxima ocorreu em períodos distintos para cada um dos tratamentos, sendo que para A aos 44 dias, D aos 52 dias e B e C aos 60 dias.

No início da estocagem obteve-se uma perda de peso que variou entre 0,34 % e 1,99 % e ao final a perda foi de 3,94 a

5,79%. Já SEIDMAN et alli (1979) observaram uma perda no início do armazenamento de 6 % (7 dias) e ao final (28 dias) 8,37 %. LIEBICH et alli (1986) detectaram a prevenção da perda de peso por DFG no início do período de estocagem. Eles obtiveram uma redução de perda de 75 a 60 % para embalagem "CRYOVAC" nos dias 35 e 42 de estocagem. Para os laminados de polietileno a redução foi de 85 a 42 % nos dias 14 e 42 de estocagem.

PERDA DE PESO PORCENTAGEM



A - BARRIER BAG B - BARRIER BAG + 2% DFG
C - BAG VAC D - BAG VAC + 2% DFG

FIGURA 14 - PORCENTAGEM DE PERDA DE PESO EM CONTRAFILÉ
 EMBALADO A VÁCUO ARMAZENADO SOB REFRIGERAÇÃO.

5.3 DETERMINAÇÃO DE pH

A tabela 35 apresenta a média dos valores de pH final de três amostras por tratamento, durante o período de estocagem, obtidos de acordo com o item 4.5.2.

TABELA 35 - MÉDIA¹ DOS VALORES DE pH EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO

PERÍODO (DIAS)	TRATAMENTOS ²				ORDEM DAS MÉDIAS ³
	A	B	C	D	
0	5,57*	5,63*	5,55*	5,57*	
12	5,66 ^a	5,68 ^a	5,58 ^a	5,52 ^{ab}	<u>B A C D</u>
24	5,39 ^c	5,40 ^d	5,41 ^b	5,39 ^c	<u>C B A D</u>
36	5,45 ^{bc}	5,47 ^c	5,47 ^{ab}	5,49 ^{abc}	<u>D B C A</u>
44	5,51 ^b	5,56 ^b	5,51 ^{ab}	5,57 ^a	<u>D B A C</u>
52	5,46 ^{bc}	5,44 ^{cd}	5,45 ^{ab}	5,42 ^{bc}	<u>A C B D</u>
60	5,48 ^{bc}	5,46 ^{cd}	5,43 ^b	5,44 ^{bc}	<u>A B D C</u>

1-Média de três amostras por tratamento

2- A - "Barrier Bag"

B - "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D - "Bag Vac" + 2% DFG

abcd - Médias na mesma coluna com a mesma letra não diferem

(P)0,05)

3- Médias na mesma linha que possuem traço contínuo comum não diferem (P) 0,05)

* - Valores médios, obtidos no frigorífico, com pHmetro portátil

De acordo com a tabela 35, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos 4 tratamentos em todos os períodos. Considerando os tratamentos isoladamente, houve um ligeiro aumento no pH, entre zero e 12 dias de armazenamento, exceto no tratamento D. Contudo, de uma maneira geral, houve um ligeiro decréscimo no pH com o avanço da estocagem. LIEBICH et alii (1986), ao contrário, não observaram queda de pH em embalagem Cryovac adicionada de DFG até aos 21 dias de estocagem sob refrigeração, que permaneceu no valor de 5,9. Em laminado de polietileno, estes mesmos autores observaram uma queda de 5,9 para 5,5. KEETON et alii (1988) não observaram variação de pH (apenas 0,1 unidades de pH) sendo significativa apenas no 7º dia de estocagem.

No período compreendido entre 12 e 24 dias deste experimento houve uma maior diminuição do pH em todos os tratamentos, fato que coincide com o maior incremento da população de bactérias lácticas, neste mesmo intervalo de tempo. Verifica-se, assim, que houve uma relação inversa entre a contagem destes microorganismos e o pH, neste período. Estes resultados sugerem que esta microbiota possa contribuir para a diminuição do pH. LEDWARD et alii (1970) afirmaram que a queda de pH em carnes armazenadas em atmosferas ricas em gás carbônico é atribuída à atividade de lactobacilos e/ou dissolução do gás carbônico nos tecidos.

5.4 DETERMINAÇÃO DA PERMEABILIDADE AO OXIGÊNIO

As amostras dos dois tipos de embalagem ("Barrier Bag" e "Bag Vac") foram submetidas aos tratamentos previos de condicionamento a seco e a úmido indicados em 4.5.4.

Os resultados obtidos para as duas embalagens e dois condicionamentos estão apresentados na tabela 36.

TABELA 36 - PERMEABILIDADE AO OXIGÊNIO (cc CNTP/M²/DIA/760mmHg)

EMBALAGEM	CONDICIONAMENTO A SECO	CONDICIONAMENTO UMIDO
"BARRIER BAG"	20,0	7,3
"BAG VAC"	8,0	10,4

De acordo com RIVZI (1981), os resultados obtidos estão dentro de valores de permeabilidade ao O₂ requerido para embalagem a vácuo, que deve ser menor que 40 cc/m²/dia atm., indicando que ambas as estruturas dos filmes utilizados neste experimento se encaixa na classificação de alta barreira. (Tabela 1).

5.5. AVALIAÇÃO DA REGENERAÇÃO DE COR E ANÁLISE DE ODOR

A avaliação da regeneração de cor foi feita de acordo com o item 4.5.5, e as análises de odor especificadas no item 4.5.3. Estes dados são apresentados na tabela 37.

TABELA 37- AVALIAÇÃO¹ DA REGENERAÇÃO DE COR² E ANÁLISE DE ODOR EM CONTRAFILÉ EMBALADO A VÁCUO.

PERÍODO (dias)	TRATAMENTOS ³				ODOR ⁴
	A	B	C	D	
0	5,00a	5,00a	5,00a	5,00a	NORMAL
12	4,67a	4,67a	4,50a	4,30a	NORMAL
24	4,83a	4,67a	4,83a	4,83a	NORMAL
36	4,50a	4,50a	4,67a	5,00a	NORMAL
44	4,67a	4,67a	4,67a	4,83a	ÁCIDO
52	4,50a	4,17a	4,50a	4,17a	ÁCIDO
60	4,67a	5,00a	4,67a	4,67a	ÁCIDO

1- AVALIAÇÃO: Após exposição ao ar frio por 20 minutos.

0 (zero)- muito ruim

5 (cinco) - muito boa

2- Média de três amostras por tratamento

3- A - "Barrier Bag"

B - "Barrier Bag" + 2% DFG

C - "Bag Vac"

D - "Bag Vac" + 2% DFG

a- Médias na mesma linha que possuem a mesma letra não diferem ($p > 0,05$)

4- Avaliação feita pelos pesquisadores, logo após a amostragem microbiológica.

Durante a armazenagem não se observou diferença significativa ($P > 0,05$) comparando-se os quatro tratamentos em um mesmo período. Estes resultados não estão de acordo com os dados apresentados por KEETON et alli (1988). Estes autores, trabalhando com carne bovina embalada a vácuo e estudando o efeito do DFG durante a armazenagem de 45 dias, observaram que as amostras com DFG recuperaram moderadamente a cor vermelho brilhante, enquanto que os controles apresentaram cor vermelho escuro, tendo encontrado diferença significativa ($p < 0,05$) somente aos 28 dias de estocagem, com vantagem para os tratamentos com DFG na recuperação da cor.

GRIFFIN et alli (1982) observaram completa regeneração de cor na carne, após 15 minutos da abertura da embalagem. Estes autores também não detectaram diferenças significativas entre os diferentes tipos de embalagem.

A partir de 44 dias de estocagem algumas amostras apresentaram odores ácidos, descritos como acres ou a "queijo". Estes odores não são característicos de carne, levando portanto à limitação da vida de prateleira deste produto. Aos 60 dias de estocagem, todas as amostras avaliadas apresentaram odores alterados. Esta alteração é descrita por CANTONI et alli (1989). Eles isolaram cepas de microrganismos produtores deste odor em carne bovina embalada a vácuo, determinando sua natureza química. Os responsáveis por este odor são microrganismos de incertae sedis, que podem se multiplicar em temperaturas de refrigeração, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico).

6. CONCLUSÕES

- 1- Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação aos dois tipos de embalagem estudados e a adição de DFG, com poucas exceções, entre médias de contagens de microrganismos deterioradores e patogênicos
- 2- A microbiota psicrotrófica isolada e identificada do contra-filé embalado a vácuo foi dominada por *Lactobacillus* spp, a partir 12º dia de armazenamento.
- 3- Não foram detectadas *Salmonella* ou *Yersinia enterocolitica* em qualquer dos tratamentos, durante todos os períodos de estocagem sob refrigeração
- 4- Observou-se um efeito antagônico entre *B. thermosphacta* e bactérias lácticas no período de 12 dias de armazenamento sob refrigeração, indicando uma possível inibição do primeiro pelo segundo.

- 5- Entre os microrganismos patogênicos, *Staphylococcus aureus* desenvolveu-se, atingindo populações de $1,6 \log \text{ UFC/cm}^2$ no período de 24 dias ,observando-se posteriormente um rápido um decréscimo.
- 6 - As populações microbianas deterioradoras não atingiram níveis maiores ou iguais a $7 \log \text{ UFC/cm}^2$, durante todo o período de estocagem
- 7 - Dentre os microrganismos patogênicos, apenas 2 cepas de *Clostridium perfringens* foram isoladas no período zero de armazenamento, não sendo isolado nos períodos subsequentes.
- 8 - Entre as enterobacterias isoladas e identificadas houve predominância de *Serratia* spp durante todos períodos de estocagem, com exceção do 12º dia de armazenamento, quando predominou *Enterobacter* spp.
- 9 - Apesar do contrafilé embalado a vácuo ter apresentado um bom perfil microbiano, a vida de prateleira do produto foi limitada pela alteração de odor , percebida a partir dos 44 dias de armazenamento.

10- Em relação às porcentagens de perda de peso, a adição de DFG não causou diferenças significativas ($p > 0,05$), embora os tratamentos adicionados de DFG tenham apresentado perdas de peso numericamente inferiores aos demais.

11- Apesar de ter-se conseguido apenas redução numérica da perda de peso com a utilização de DFG, em termos econômicos esta redução pode ser significativa, porém devem ser avaliadas as relações custo/benefício na introdução de uma nova etapa dentro de um processamento industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ASGHAR, A. & YEATES, N.T.M. The mechanism for the promotion of tenderness in meat during the post-mortem process: A Review. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 10 (2):115-145, 1978.
- 2 - ASTM- Standart test method for oxigen gas transmission rate through plastic film and sheeting D-3985,1981.
- 3 - AULISIO, C.C.G.; MEHLMAN, I.J.; SANDERS, A.C. Alkali method for rapid recovery of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* form foods. Appl. Environmen. Microb. 39(1):135-140, 1980.
- 4 - BARTELS, H.; KLARE, H.J.; WOHNER, T.A.H.P. Frische und Qualitat bei portionen fleish. Fleischwirtschaft 4:486-489, 1973.
- 5 - BOWLING, R.A.; CARPENTER, Z.L.; SMITH, G.C.; HOKE, K.E. Vacuum pack-aging systems for subprimal beef cuts. J. Anim. Sci. 45(6): 1280-1288, 1977.
- 6 - BREIDESTEIN, B.B. Wholesale Packaging for fresh meat. In: International Simposium of Meat Science and Technology. 1982.Proccedings. Lincoln, Nebraska. 343-351.
- 7 - BRONWLIE, L.E. Effect of some environmental factors on psychophilic microbacteria. Journal of Applied Bacteriology 29(3):447-54, 1966.
- 8 - CAMPBELL, R.J.; EAGAN, A.F.; GRAU, F.H.; SHAY, B.J. The growth of *Microbacterium thermosphacta* on beef. J. Appl. Bacteriol. 47(3): 505-509, 1979.
- 9 - CANTONI, C.; COMI, G.; GENARI, M. *Microbacterium* spp e *Brochothrix thermosphacta* in proddotti carnei. Industrie Alimentari 22(203): 165-167, 1983.
- 10 - CANTONI, C.; BERSANI, C.; FRIGERIO, R. Una nuova alterazione delle carni bovine confezionate sottovuoto. Industrie Alimentari. 28:696-699, 1989.
- 11 - CHRISTOPHER, F.M.; CARPENTER, Z.L.; DILL, C.W.; SMITH, G.C.; VANDER ZANT, C. Microbiology of beef, pork and lamb stored in a vacuum or modiflicated gas atmopheres. J. Food Prot. 43(4):259-264, 1980.
- 12 - COLE Jr., A.B. Retail packaging systems for fresh red meat cuts. In: Reciprocal meat Conference, 1986. Proccedings 106-111.

- 13 - DAESCHELL, M.A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. 43:164-167, 1989.
- 14 - DANIELS, J.A.; KRISHNAMURTHI, R.; RIVZI, S.S.H. A review of effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal of Food Protection*. 48(6): 532-537, 1985
- 15 - DAUN, H.; GILBERT, S.G. How film choices affects shelf life of packaged meats. *Meat Research Institute* 24(4): 49-51, 1979.
- 16 - DAVIDSON, C.M.; MOBBS, P.; STUBBS, J.M. Some morphological and physiological properties of *Microbacterium thermosphactum*. *J. Appl. Bacteriol.* 31(4): 551-559, 1968.
- 17 - DELAZARI, I. Controle do desenvolvimento microbiano em carnes frescas. In: II Curso Internacional sobre Tecnologia da Carne. 1981, Anais. CTC - ITAL, São Paulo, 19.1 a 19.9.
- 18 - DIXON, N.M.; KELL, D.B. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *J. Appl. Bacteriol.* 67(1): 109-136, 1989.
- 19 - EDWARDS, P.R.; EWING, W.H. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed. Burgess Publishing Company. 1972. 362pp.
- 20 - EFFENBERGER, G.; SCHOTTI, K. Empaquetado de la carne y productos carnicos. Acribia, Zaragoza. 1972. 186pp.
- 21 - EUSTACE, I.J. Some factors affecting oxygen transmission rates of plastic films for vacuum packaging of meat. *J. Food Technol.* 16: 73-80, 1981.
- 22 - FINNE, G. Modified and controlled-atmosphere storage of muscle foods. *Food Technology*. 36(2): 128-133, 1982.
- 23 - GARDNER, G.A. A selective medium for enumeration of *Microbacterium thermosphactum* in meat and meat products. *J. Appl. Bacteriol.* 29(3): 455-60, 1966.
- 24 - GEHRKE, W. Packaging Procedures and materials. *Meat processing* June: 54, 56-66, 1982.
- 25 - GILBERT, S.G. HUANG-LAI, G.R.; LAI, C.C. Environmental and material composition effects on film permeability as related to meat packaging. In: 36th. Ann. Recip. Meat Conf. Proceedings 1983. p47-54.
- 26 - GILL, C.O. Meat spoilage and evaluation on the potential storage life of fresh meat. *Journal of Food Protection*. 46(5): 444-452, 1983

- 27 - GILL, C.O.; NEWTON, K.G. Spoilage of vacuum-packaged dark, firm, dry meat at chill temperatures. *Appl. Environm. Microbiol.* 37(3): 362-364, 1979.
- 28 - GILL, C.O.; NEWTON, G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Sci.* 2(3):207-17, 1980.
- 29 - GRAU, F.H. The spoilage of meat and meat products. *Food Technol in Australia* 30(10):385-88, 1978.
- 30 - GREER, G.G. Bacteria and meat quality. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.* 22(2): 116-117, 1988.
- 31 - GRIFFIN, D.B.; SAVELL, J.W.; SMITH, G.C. VANDERZANT, C.; TERRELL, R. N.; LIND, K.D.; GALLOWAY, D.E. Centralized packaging of beef loins steaks with different oxygen-barrier films: Physical and sensory characteristics. *J. Food Sci.* 47: 1059-1069, 1982.
- 32 - HANNA, O.M.; ZINN, D. L.; CARPENTER, Z.L.; VANDERZANT, C. *Yersinia enterocolitica*-like organisms from vacuum packaging beef and lamb. *J. Food Sci.* 41(5):1224-1256. 1976.
- 33 - HODGES, J.H.; CAHILL, V.R.; OCKERMAN, H.W. Effect of vacuum packaging on weight loss, microbial growth and palatability of fresh beef wholesale cuts. *J. Food Sci.* 39: 143-146, 1974.
- 34 - HOOD, D.E. Factors affecting the rate of metmyoglobin accumulation in pre-packaged beef. *Meat Science* 4:247-265, 1980.
- 35 - HOTCHKISS, J.H. Experimental approaches to determining the safety of food packaged in modified atmospheres. *Food Technology* 42(9): 55-64, 1988.
- 36 - JAYE, M.; KITAKA, R.S.; ORDAL, Z.J. The effect of temperature and packaging material on the storage life and bacterial flora of ground beef. *Food Technol.* 16(4):95-98, 1962.
- 37 - KEETON, J.T.; LEU, R.; VANDERZANT, E.; BOHAC, J.J.; GRIFFIN, D.B.; SANELL, J.W.; CROSS, H.R. Evaluation of fresh vacuum-packaged beef steaks coated with an acetylated monoglyceride. *J. Food Sci.* 53(3):701-710, 1988.
- 38 - KESTER, J.J.; FENNEMA, O.R. Edible films and coatings: A review. *Food Technol.* 40(12):47-59, 1986.
- 39 - KENNEDY JR, J.E.; OBLINGER, J.L.; WEST, R.L. Rate of *Salmonella infantis*, *Staphylococcus aureus* and *Hafnia alvei* in vacuum packaged beef plate pieces during refrigerated storage. *J. Food Sci.* 45:1273-1300. 1980.

- 40 - KENNEDY JR, J.E.; OBLINGER, J.L.; WEST, R.L. Microbiological comparison of hot-boned and conventionally processed beef plate cuts during extended storage. J. Food Prot. 45(7): 607-614, 1982.
- 41 - KROFF, D.H.; HUNT, M.C.; PISKE, D. Color formation and retention in fresh meat. In: 21st Meat Indust. Res. Conf. 1985. Chicago, Illinois. (copia mimeografica).
- 42 - LANARA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. I- Métodos Microbiológicos. Ministério da Agricultura. Brasília, DF. 1981.
- 43 - LEE, J.Y.; FUNG, D.Y.C. Methods for sampling meat surfaces. J. of Enviromental Health. 48(4): 200-205, 1986.
- 44 - LEE, B.H.; SIMMAARD, R.E.; LALAYE, C.L.; HOLLEY, R.A. Shelf life of meat loaves package in vacuum or nitrogen gas. I. Effect of sotage temperature, light and time on the microflora change. J. Food Prot. 47(2):128-133, 1981.
- 45 - LIEBICH, H.; JOCHLE, W.; MAYER, E. Coating chilled beef cuts with acetylated monoglycerides for prolongation of freshness and reduction of weight loss from purge. J. Vet. Med. B 33:740-750, 1986.
- 46 - LIVINGSTON, D.J.; BROW, W.D. The chemistry of mioglobin and its reactions. Food Technol. 35:244, 1981
- 47 - LUCE, G.T. Acetylated mmonoglycerides as coatings for select foods. Food Technol. 21:48-54. 1967.
- 48 - MADI, L.F.C.; NORMAN, G.A.; SOLER, R.M.; CABRAL, A.C.D. Desenvolvimentos em tecnologia de embalagem para carne. II Congresso Brasileiro de Embalagens. ANAIS. SP, 1980.
- 49 - MEHLMAN, I.J.; AULISIO, C.C.G.; SANDERS, A.C. Problems in recovery and identification of Yersinia from foods. JAOAC 6(4):761-771, 1978.
- 50 - MOLLINS, R.A.; KRAFT, A.A.; MARCY, J.A. Extension of the shelf-life of fresh ground pork with polyphosphates. J. Food Sci. 52(2): 513-514, 1987.
- 51 - NEWSOME, R.L.; LANGLOIS, B.E.; MOODY, W.G.; GRAY, N.; FOX, J.D. Effect of time and method of aging on the composition of the microflora of the beef loins and corresponding steaks. J. Food Prot. 47(2):114-118. 1984.
- 52 - NEWTON, K.G.; GILL, C.O. The microbiology of DFD meats: A review. Meat Science. 5:223-232, 1980.

- 53 - NEWTON, K.G.; GILL, C.O. The development of anaerobic spoilage flora of meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 44(1):91-95, 1978.
- 54 - NEWTON, K.G.; HARRISON, J.L.C.; WAUTERS, A.M. Sources of Psychrotrophic bacteria on meat at the abattoir. *Journal of Applied Bacteriology*. 45(1): 75-82, 1978.
- 55 - NEWTON, K.G.; RIGG, W.J. Effects of film permeability on the shelf life and microbiology of vacuum packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* 47(3):433-41, 1979.
- 56 - NICOL, D.J.; SHAW, M.K.; LEDWARD, D.A. Hydrogen sulfide production by bacteria and sulfomyoglobin formation in prepackaged chilled beef. *Appl. Microbiol.* 19(6):937-39, 1970.
- 57 - PAGLIARO, A.F.; DAGATH, A.R.; DALLESANDIA, A.V.H. Some factors affecting colour preservation of chilled vacuum packed primal beef cuts under prolonged storage. In: *MRI Symposium, 1972. n° 2 Meat chilling - Why and How?*.
- 58 - PARISI, E.; GIACONNE, V. Problematica della microbiologia delle carni fresche: recenti acquisizioni. *Industrie Alimentari* 22(211):945-952, 1983.
- 59 - PIERSON, M.D.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; ORDAL, Z.J. Microbiological sensory and pigment changes of aerobically and anaerobically packaged beef. *Food Technol.* 24(10):1171-1175, 1970.
- 60 - RAO, D.N.; SREENIVASAMURTHY, V. A preliminary study of the effect of urea in the preservation of meat. *Meat Science*. 17:251-265, 1986.
- 61 - RENERRE, M. Retail storage and distribution of meats in modified atmospheres. *Fleischwirtschaft* 68(9): 1150-1152, 1988.
- 62 - RIZVI, S.S.H. Requirements for food packaged in polymeric films. *CRC in Food Sci. and Technol.* 14(2):111-134, 1981.
- 63 - RIZVI, S.S.H. Flexible packaging material properties that influence shelf life. In: *Am. Meat Sci. Association. Proceedings of the Meat Industry Conference. New Orleans, Louisiana, September: pp 125-141. 1984a.*
- 64 - ROSSET, R. Conservation de la viande sous atmosphere controlee. *Ann. Nutr. Alim.* 32:545-560, 1978.
- 65 - ROTH, L.A.; CLARK, D.S. Studies on the bacterial flora of vacuum-package fresh beef. *Can. J. Microbiol.* 8(11):1761-1766, 1972.

- 66 - ROTH, L.A.; CLARK, D.S. Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of *Microbacterium thermosphactum* on fresh beef. *Can. J. Microbiol.* 21(5):629-32, 1975.
- 67 - SACAROW, S. A functional review of fresh meat wraps. *Food Eng.* 46(3):87-90, 1974.
- 68 - SEELYE, R.J.; YEARBURY, B.J. Isolation of *Yersinia enterocolitica* resembling organisms and *Alteromonas putrefaciens* from vacuum packaged chilled beef cuts. *J. Appl. Bacteriol.* 46(3):493-499, 1976.
- 69 - SEIDMAN, S.C.; VANDERZANT, C.; SMITH, G.C.; HANNA, M.D.; CARPENTER, Z.L. Effect of degree of vacuum and length of storage on the microflora of vacuum packaged beef wholesale cuts. *J. Food Sci.* 41(4):738-42, 1976a.
- 70 - SEIDMAN, S.C.; CARPENTER, Z.L.; SMITH, G.C.; HOKE, K.E. The effect of vacuum and length of storage on the physical characteristics of vacuum packaged beef wholesale cuts. *J. Food Sci.* 41(4):732-737, 1976b.
- 71 - SEIDMAN, S.C.; VANDERZANT, C.; HANNA, M.D.; CARPENTER, Z.L.; SMITH, G.C. Effect of various types of vacuum packages and length of storage on the microbial flora of wholesale and retail cuts of beef. *J. Milk Food Technol.* 39(11):745-753, 1976c.
- 72 - SEIDMAN, S.C.; CARPENTER, Z.L.; SMITH, G.C.; VANDERZANT, C.; HOKE, K.E. A comparison of vacuum packaging systems and films on the physical characteristics of beef cuts. *J. Milk Technol.* 39(11):740-744, 1976d.
- 73 - SEIDMAN, S.C.; SMITH, G.C.; CARPENTER, Z.L.; DUSTON, T.R.; DILL, C.W. Modified gas atmospheres and changes in beef during storage. *J. Food Sci.* 44:1036, 1979.
- 74 - SEIDMAN, S.C.; DURLAND, P.R. Vacuum packaging of fresh beef: a review. *J. Food Qual.* 6(1):29-47, 1983.
- 75 - SHERIDAN, J.T.; SHERINGTON, J. The microbiology of hot and conventionally deboned vacuum packaged beef. *Meat Sci.* 7(4):245-58, 1982.
- 76 - SIMMARD, R.E.; LEE, B.H.; LALEYE, C.L. Effects of temperature and storage time on the microflora, sensory and exudates changes of vacuum nitrogen packages beef. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 18(2):126-132, 1985.
- 77 - SPECK, M.L. ed. *Compendium of methods of the microbiological examination of foods.* APHA. 1976.

- 78 - SWANINATHAN, B.; HARMON, M.C.; MEHLMAN, I.J. A review *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 52(2): 151-183. 1982
- 79 - SWANSON, H.D. Sources of carcass contamination. *Meat Processing Applied* 40, 1982.
- 80 - TAN, K.H.; GILL, C.O. Physiological basis of CO₂ inhibition of meat spoilage bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Meat Science* 7:9-17, 1982
- 81 - TAYLOR, A.A. Retail packaging systems for fresh meat. In: *Meat Sci. and Technol. Intern. Symposium, 1982. Proceedings*. pp-333-366.
- 82 - TAYLOR, A.A. Packaging of fresh meat. In: *Lowrie, R. Development of meat science*. 1st. ed London, Elsevier. 1985
- 83 - United States Department of Health, Education and Welfare. FDA. *Bacterial analytical manual for foods*. 6th ed
- 84 - VANDERZANT, C.; NICKELSON, . . . A microbiological examination of muscle tissue of beef, pork and lamb carcasses. *J. Milk Food Technol.* 32(9): , 1969
- 85 - VANDERZANT, C.; SMITH, G.C.; HANNA, M.D.; ZINK, D.L. New potential pathogens in fresh meats. In: *Recip. Meat Conference Proceedings, 1980* 33:59-62
- 86 - ZAMORA, M.C.; ZARITZKY, N.E. Modeling of microbial growth in refrigerated package beef. *J. Food Sci.* 50:1003-1006. 1985