

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**SISTEMAS DE EMBALAGENS PARA CARNE BOVINA FRESCA EM
ATMOSFERA MODIFICADA CONTENDO REDUZIDO NÍVEL DE
MONÓXIDO DE CARBONO E ELEVADAS CONCENTRAÇÕES DE
DIÓXIDO DE CARBONO**

ANNA CECILIA VENTURINI

Engenheira de Alimentos

Orientador: **PROF. DR. JOSÉ DE ASSIS FONSECA FARIA**

Co-Orientador: **PROF^A. DR^A. CARMEN JOSEFINA CONTRERAS CASTILLO**

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

V568s Venturini, Anna Cecilia
Sistemas de embalagens para carne bovina fresca em atmosfera modificada contendo reduzido nível de monóxido de carbono e elevadas concentrações de dióxido de carbono / Anna Cecilia Venturini. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: José de Assis Fonseca Faria
Co-orientador: Carmen Josefina Contreras Castillo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Carne bovina. 2. Atmosfera modificada. 3. Monóxido de carbono. 4. Carboximioglobina. 5. Cor. 6. Microbiologia. I. Faria, José de Assis Fonseca. II. Contreras Castillo, Carmen Josefina. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Modified atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide for fresh beef packaging

Palavras-chave em inglês (Keywords): Beef, Modified atmosphere, Carbon Monoxide, Carboxymyoglobin, Color, Microbiology

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: José de Assis Fonseca Faria

Carlos Alberto Rodrigues Anjos

Exedito Tadeu Facco

Leda Coltro

Maria Teresa de Alvarenga Freire

Pedro Eduardo de Felício

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria - Orientador/Presidente
FEA - UNICMAP

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos - Membro Titular
FEA - UNICAMP

Dr. Expedito Tadeu Facco – Membro Titular
CETEA – ITAL

Dra. Leda Coltro - Membro Titular
CETEA - ITAL

Dra. Maria Teresa de Alvarenga Freire – Membro Titular
FZEA – USP

Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício – Membro Titular
FEA - UNICAMP

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL.....	ix
SUMMARY.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Referências Bibliográficas.....	3
CAPÍTULO 1.....	4
USO DE MONÓXIDO DE CARBONO EM EMBALAGEM DE CARNE FRESCA	4
1. Revisão Bibliográfica.....	4
1.1. A química da cor da carne fresca.....	4
1.2. Sistemas de embalagens para carne fresca.....	5
Referências Bibliográficas.....	17
CAPÍTULO 2.....	21
Microbiological, Color and Sensory Properties of Fresh Beef Steaks in Low Carbon Monoxide Concentration with or without Oxygen.....	21
1. Introduction	22
2. Materials and Methods.....	24
3. Results and Discussion	30
4. Conclusion.....	48
References.....	50
ANEXOS.....	54
CAPÍTULO 3.....	62
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE MONÓXIDO DE CARBONO EM DIFERENTES SISTEMAS DE EMBALAGENS PARA CARNE BOVINA FRESCA.....	62
RESUMO	62
SUMMARY.....	63

1 - INTRODUÇÃO	64
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	66
2.1 - Porcionamento dos bifes e embalagem em atmosfera modificada (AM)	66
2.2 - Avaliação de pH	68
2.3 - Composição gasosa	68
2.4 - Avaliação sensorial.....	69
2.5 - Cor instrumental	70
2.6 - Análises microbiológicas	70
2.7 - Avaliação estatística	71
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
3.1 - Avaliação do pH	71
3.2 - Composição gasosa	71
3.3 - Avaliação sensorial e instrumental da cor.....	74
3.4 - Avaliação microbiológica dos bifes de alcatra e contrafilé	82
4. CONCLUSÃO.....	86
Referências Bibliográficas	88
ANEXOS	92
CAPÍTULO 4.....	98
EMBALAGEM DE DISTRIBUIÇÃO COM ATMOSFERA MODIFICADA PARA CARNE BOVINA FRESCA CONTENDO 0,2% DE MONÓXIDO DE CARBONO (CO) E ALTAS CONCENTRAÇÕES DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO ₂).....	98
1 - INTRODUÇÃO	100
2 - MATERIAIS E MÉTODOS	104
2.1 – Matéria-prima.....	104
2.2 – Sistema de embalagem	104
2.3 - Composição gasosa	105
2.4 - Avaliação do pH	106
2.5 - Análise microbiológica	106
2.6 - Análise sensorial.....	106
2.7 - Cor instrumental	107
2.8 - Oxidação lipídica.....	108

2.9 - Análise estatística	108
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
3.1 - Composição gasosa no espaço-livre das embalagens de distribuição	109
3.2 - Cor inicial e pH.....	110
3.3 - Análise microbiológica	111
3.4 - Análise sensorial.....	118
3.4.1 - Interação músculo x tratamento.....	118
3.4.2 - Interação corte x tempo de estocagem em AM	121
3.4.3 - Interação corte x tempo de exposição ao oxigênio atmosférico.....	124
3.5 - Análise instrumental.....	126
3.6 - Oxidação lipídica.....	132
4 - CONCLUSÃO	132
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXOS.....	136
CONCLUSÃO GERAL	144
LISTA DE ARTIGOS.....	146

*Ao Narci e à minha amada filha Giovanna,
minha maior motivação em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria e à Profa. Carmem J.C. Contreras pela orientação e inestimável colaboração e amizade, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo pela valiosa colaboração.

À AGA S.A. - Linde Group (Jundiaí, SP), nas pessoas de Odillo Garutti, Rodrigo Setti, Paula Telaarolli e Isidoro e ao Frigorífico Marfrig (Promissão, SP, Brasil), na pessoa do Dr. Renato Macedo, pelo apoio técnico, material, logístico e principalmente pela confiança na obtenção dos resultados deste trabalho.

Às empresas Didai Tecnologia, Standa Industrie, Emplal, Ulma e Ilpra que gentilmente nos cederam material e equipamentos para a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – São Paulo, SP, Brazil), Projeto de Pesquisa nº. 04/14644-8.

À equipe de análise sensorial do Departamento de Agroindústria e Nutrição da ESALQ-USP pela habilidade e colaboração em todas as sessões de análise. Agradecimento especial à Ligianne Din Shirahigue, Tâmara Zago Silva e Cecília Helena Nogueira pela habilidosa assistência técnica.

À Maria de Lourdes da Rosa pela sua dedicação, carinho e suporte.

E a todos que de alguma maneira contribuíram com a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

A embalagem da carne bovina fresca em atmosfera modificada é um sistema complexo e dinâmico em que vários fatores interagem para a manutenção da qualidade do produto. A concentração de gases ao redor do produto e as condições de estocagem podem decisivamente influenciar a estabilidade da cor e a qualidade microbiológica da carne acondicionada em atmosfera modificada. Portanto, a determinação de um sistema de embalagem para a manutenção da qualidade da carne fresca envolve a otimização de múltiplas variáveis: composição gasosa, razão entre volume do gás e massa do produto, taxa de permeabilidade a gases da embalagem, tempo e temperatura de estocagem, entre outras.

Através dos experimentos realizados foi possível avaliar vários sistemas de embalagens, institucionais e convencionais, e conhecer como importantes variáveis de processo interagem durante a estocagem e a exposição da carne ao varejo.

A revisão bibliográfica apresentada no Capítulo 1 foi realizada para resumir de forma compreensível a literatura até a presente data, visando facilitar a aplicação apropriada de misturas gasosas para fins comerciais específicos, e também para auxiliar os profissionais da indústria da carne na seleção de sistemas de embalagem de forma a atender efetivamente os seus interesses.

No Capítulo 2, bifes de alcatra e contrafilé foram acondicionados em bandejas plásticas de alta barreira a gases em atmosfera contendo 30% de CO₂ e concentrações variáveis de CO (0,2-0,4%), O₂ (0-21%) e N₂ (balanço) com o objetivo de se determinar a melhor mistura contendo CO capaz de controlar a estabilidade da cor e promover a inibição do crescimento microbiano.

No Capítulo 3 as relações entre descoloração e odor desagradável foram avaliadas para se analisar os efeitos da concentração residual de oxigênio combinado com altos teores de CO₂ (30 e 100%) sobre a reoxigenação e a qualidade microbiológica da carne fresca embalada com ou sem CO (0,2%).

No teste final, Capítulo 4, a menor concentração de CO (0,2%) capaz de produzir uma cor atrativa foi associada às altas concentrações de CO₂ (60% e 99,8%) para aumentar a vida útil de bifes de três músculos bovinos (*longissimus dorsi*, *gluteus medium* e *psaos major*) e da carne moída (*triceps brachii*) que foram escolhidos devido ao fator econômico e por apresentarem diferenças intrínsecas de estabilidade de cor entre si.

Palavras-chave: carne bovina, atmosfera modificada, monóxido de carbono, carboximioglobina, cor, microbiologia

SUMMARY

The packaging of fresh beef in a modified atmosphere is a complex and dynamic system in which various factors interact for the maintenance of the quality of the product.

The concentration of gases surrounding the product and the storage conditions could decisively influence the stability of the color and microbiological quality of the meat conditioned under modified atmosphere. Therefore, the optimization of a packaging system to maintain the quality of fresh meat involves or is determined by several variables: the gaseous composition, the ratio between the gas volume and the product weight, the gas permeability of the package, time and temperature of the storage, among others.

Through the experiments which were carried out, it was possible to evaluate various packaging systems, institutional and conventional, and to understand how important variables of the process interact during the storage and retail exposure of the meat.

The literature review presented in Chapter 1 was achieved by trying to summarize in a comprehensive and readable form until the present date, looking for the easiest way to apply the appropriate gaseous mixtures for a specific commercial purpose, and also to support the professionals in the meat industry in the selection of most appropriate packaging systems to effectively meet their interests and needs.

In Chapter 2 sirloin and rib eye steaks were conditioned to the primary packaging in a modified atmosphere 30% of CO₂ and variable concentrations of CO (0.2-0.4%), O₂ (0-21%) and N₂(balanced) with the goal of determining the best mixture containing CO with the ability to match the optimum microbiological growth inhibition and color stability.

In Chapter 3 the interrelationship between the discoloration and off-odor were evaluated by determining the concentrated residual effects of oxygen combined with high

levels of CO₂ (30 and 100%) which results in the reoxygenation and microbiological quality of fresh meat wrapped with or without CO (0.2%).

In the final experiment, Chapter 4, the lowest concentration of CO (0.2%) with the ability to produce an attractive color, was associated with high concentrations of CO₂ (60% and 99.8%) to extend the shelf life of the steaks from three types of beef muscles (*longissimus dorsi*, *gluteus medius* and *psoas major*) and of ground meat (*triceps brachii*).

Keywords: beef, modified atmosphere packaging, carbon monoxide, carboxymyoglobin, color

INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil encerrou 2006, pelo quarto ano consecutivo, como líder mundial nas exportações de carne bovina, consequência da adequação do mercado às exigências internacionais, que obrigou o país a fazer crescentes investimentos em qualidade e estabelecer novos padrões de produção, industrialização e comercialização do produto (ANUALPEC, 2007).

Apesar do aumento das exportações de carne, o que se registra no cenário interno é uma competitividade baseada exclusivamente no preço. Para as grandes redes varejistas, que detêm o maior poder de negociação, a carne fresca continua sendo um *commodity*, um produto com baixo valor agregado e sem diferenciação, adquirida dos frigoríficos com baixo potencial competitivo nas exportações. Isto pode ter como consequência um produto que chega ao consumidor com baixa qualidade, sem garantias de segurança, oriundo de um processo produtivo com inúmeros pontos de falhas de controle nos diversos elos da cadeia produtiva.

Grande parte dos problemas de qualidade da carne bovina comercializada no mercado interno está relacionada com a falta de inspeção sanitária e/ou fiscal (Felício, 2001). Para ilustrar, vale dizer que o abate clandestino é responsável por aproximadamente 40% do mercado nacional, estabelecendo uma concorrência desleal com o produto fiscalizado (Pinatti, 2007). Esta situação se mantém em parte pelo oportunismo de todos os agentes envolvidos, mas também pela impossibilidade do consumidor identificar a existência de produtos diferenciados, já que no balcão de um açougue “carne é carne”. Uma das formas de se promover a diferenciação e garantir a qualidade da carne fresca que chega ao consumidor é a centralização das operações de corte e embalagem ao varejo em plantas processadoras, localizadas próximas aos frigoríficos, sob inspeção higiênico-sanitária.

O prévio acondicionamento em bandejas, pelo próprio frigorífico, permite que a carne depois de embalada só seja reaberta pelo próprio consumidor. Além disso, o prévio acondicionamento permite a rotulagem com informações a respeito do corte e a criação de

uma marca, como ferramenta para conquistar a confiança do consumidor e agregar valor ao produto.

Atualmente, existem diversos sistemas de embalagens contendo atmosfera modificada desenvolvidos para carne bovina acondicionada em bandeja, e pelo menos uma dúzia deles estão sendo utilizados comercialmente nos Estados Unidos da América e na Europa (Brody, 2002).

Novos formatos estão sendo desenvolvidos especificamente para permitir a centralização das operações de embalagem e distribuição da carne fresca porcionada e rotulada na bandeja pela indústria da carne (Belcher, 2006). Comercialmente, o sistema de embalagem em atmosfera modificada mais utilizado com a carne fresca emprega altas concentrações de oxigênio (O_2) em combinação com dióxido de carbono (CO_2), normalmente 60-80% O_2 /20-40% CO_2 (Eilert, 2005).

Em 2002 a Food and Drug Administration autorizou o uso de baixa concentração de monóxido de carbono (0,4% CO) na embalagem secundária da carne e posteriormente, em 2004, a sua aplicação direta em embalagens primárias (FDA, 2004). Esses formatos já estão disponíveis no mercado americano (Belcher, 2006) e, inevitavelmente, têm potencial para alterar o mercado.

A principal desvantagem técnica do uso de CO é que se os produtos forem estocados sob condições inadequadas de temperatura, a persistente cor vermelha pode mascarar evidências visuais de deterioração, ainda que o odor desagradável da carne verdadeiramente deteriorada esteja alterado. No entanto, não há um maior risco de bactérias patogênicas associadas com a embalagem com CO do que com qualquer outro sistema de embalagem utilizado para carne fresca. Vários trabalhos científicos têm validado a segurança da aplicação do CO para a embalagem da carne fresca, demonstrando que a presença ou ausência de bactérias patogênicas na carne independe da cor (Sebranek et al, 2006).

Embora várias pesquisas já tenham sido desenvolvidas sobre o aspecto sensorial e microbiológico da carne em atmosfera de CO, os benefícios da aplicação de níveis menores do que 0,4%, na embalagem da carne fresca em atmosfera livre de oxigênio foram pouco explorados.

O objetivo deste trabalho foi aumentar a vida útil da carne fresca porcionada em bandeja, na forma de bifes ou moída, utilizando um sistema de embalagem em atmosfera modificada, combinando reduzido nível de CO (0,2%) e elevadas concentrações de CO₂. Os músculos utilizados neste trabalho (*Gluteus medius*, *Longissimus dorsi*, *Triceps brachii* e *Psoas major*) foram escolhidos por seu interesse econômico e por apresentarem diferenças intrínsecas de estabilidade de cor entre si.

Referências Bibliográficas

ANUALPEC 2004: **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo, 14^aed, FNP Consultoria & Comércio, 368 p.

BELCHER, J.N. Industrial packaging developments for the global meat market. **Meat Science**, v.74, p.143-148, 2006.

BRODY, A.A. Action in active and intelligent packaging. **Food Technology**, v.56, n.2, p. 70-71, 2002.

EILERT, S.J. New packaging technologies for the 21st century. **Meat Science** v.71, p.122-127, 2005.

FELÍCIO, P.E. de Sistemas de qualidade assegurada na cadeia de carne: a experiência brasileira. In: 1^o CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES. 2001, São Pedro: Centro de Tecnologia de Carnes - ITAL, p.342-353.

PINATTI, E. Produtividade da bovinocultura de corte paulista em 2005. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.37, n.6, jun. 2007.

SEBRANEK J.C., HUNT, M.C., CORNFORTH D.P. & BREWER, M.S. Carbon Monoxide Packaging of Fresh Meat. **Food Technology**, v.60, n.5, p.184, 2006.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USDA). GRAS notice nr GRN 000143 (2004). Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g143.html>. Acesso em: 05 jun. 2007

CAPÍTULO 1

USO DE MONÓXIDO DE CARBONO EM EMBALAGEM DE CARNE FRESCA

1. Revisão Bibliográfica

1.1. A química da cor da carne fresca

A aparência visual é o principal critério no qual o consumidor se baseia na hora da compra de produtos cárneos, sendo assim é extremamente importante manter a qualidade da cor vermelha da carne fresca durante a sua distribuição, estocagem e comercialização.

Após a sangria, a mioglobina constitui 80-90% dos pigmentos totais da carne bovina. A mioglobina é uma proteína globular complexa, formada por um polipeptídeo, a globina e por um grupo prostético, chamado heme, responsável pela sua cor (Govindarajan, 1973). Esse grupo heme consiste de um átomo central de ferro e de um anel porfirínico plano composto por quatro anéis pirrólicos, unidos por pontes metilênicas.

Segundo Kropf (1980), na carne fresca, o principal pigmento responsável pela cor é a forma oxigenada da mioglobina ferrosa, enquanto que uma fina camada de metamioglobina oxidada, poderá ser observada a uma certa profundidade na carne seguida pela forma reduzida da deoximioglobina, conforme pode ser observado na Figura 1.

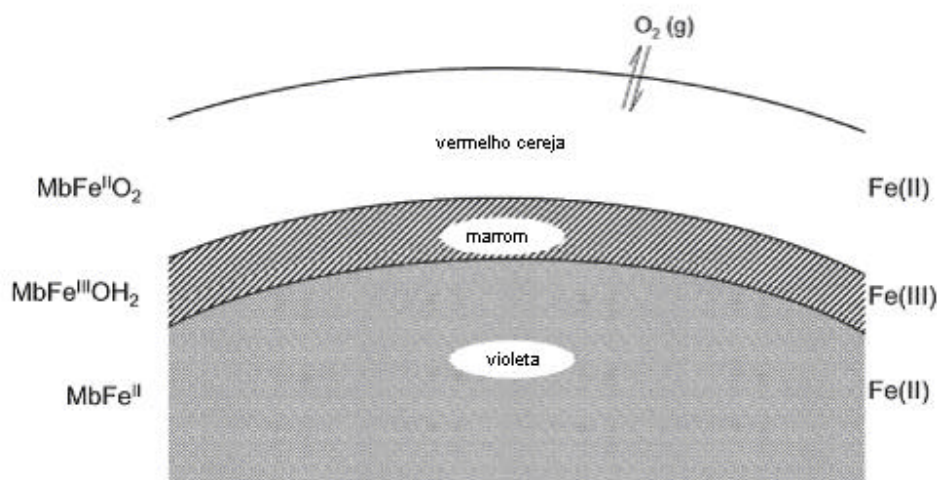


Figura 1. Ilustração esquemática das várias formas da mioglobina na carne fresca em equilíbrio com o oxigênio atmosférico (Møller & Skibsted, 2006).

Considerando que a percepção da cor da carne é devida principalmente à reflexão difusa da luz incidente, qualquer tentativa para explicar a percepção visual da carne deve considerar também as características de espalhamento e dispersão da luz pelo músculo.

O espalhamento da luz é influenciado por fatores estruturais e depende do grau de expansão das miofibrilas. A carne pálida, mole e exsudativa (PSE), por exemplo, possui uma alta capacidade de espalhar a luz, ou seja, a luz é espalhada antes que penetre na carne. Ao contrário, a carne escura, firme e seca (DFD), formada quando o pH final é alto (>6,0) espalha luz somente numa pequena extensão. Neste caso, a luz incidente penetra na carne numa substancial profundidade e é fortemente absorvida pela mioglobina. Essa carne, portanto, aparece escura (Hutchings, 1994).

1.2. Sistemas de embalagens para carne fresca

No Brasil, a Portaria 145/98 do Ministério da Agricultura tornou obrigatória a distribuição refrigerada das peças desossadas de carne em embalagens a vácuo. A embalagem a vácuo, efetivamente retarda o crescimento microbiano e a oxidação da mioglobina, estendendo a vida útil da carne fresca por várias semanas (Gill & Jones,

1994a). Porém, a grande desvantagem na aceitação da carne a vácuo é a alta rejeição da cor arroxeada da deoximioglobina devido à ausência de oxigênio, a despeito do considerável investimento comercial na educação dos consumidores para aceitação desta cor (Hood & Mead, 1993). Daí, a necessidade de duas etapas de embalagem para a exposição de carne ao varejo: a pré-embalagem das peças a vácuo para manutenção da cor vermelha e a reabertura dessas embalagens e re-embalagem em condições aeróbicas que permita fácil conversão da cor arroxeada à atrativa cor vermelha resultante da oxigenação dos pigmentos superficiais da carne (Sarantópoulos, 1991).

Assim, nos balcões de auto-atendimento dos supermercados brasileiros é altamente difundido o método convencional de acondicionamento da carne, que utiliza bandejas plásticas envoltas em filmes de alta permeabilidade ao oxigênio como o policloreto de vinila (PVC). Esse sistema combina alta permeabilidade ao oxigênio com baixa permeabilidade ao vapor de água garantindo a cor vermelha-brilhante atrativa para o consumidor no momento da compra. No entanto, a microbiota deteriorante composta principalmente por *Pseudomonas sp.* e a oxidação da oximioglobina à metamioglobina, limitam a vida útil da carne na bandeja em cerca de 1 a 2 dias, dependendo da temperatura de refrigeração e do tipo de corte (Sarantópoulos, 1991). Comercialmente, este período é muito curto para permitir a centralização das operações de embalagens em bandejas, uma vez que o tempo estimado entre a embalagem nas plantas processadoras e sua exposição ao varejo, considerando as flutuações de demanda é cerca de três semanas, freqüentemente, incluindo 7 dias para embalagem e distribuição, 7 dias para exposição ao varejo e 7 dias de estocagem na casa do consumidor (Jayasingh et al, 2001; Gill & Jones, 1994a).

Atualmente, existem vários sistemas comerciais que utilizam atmosfera modificada para aumento da vida útil da carne fresca acondicionada em bandejas. A chave para o sucesso destes sistemas, envolve a introdução de uma mistura gasosa capaz de retardar a oxidação da cor vermelha além de inibir o desenvolvimento da microbiota deteriorante ou patogênica.

Nas embalagens em atmosfera modificada normalmente são utilizadas misturas de oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂) e nitrogênio (N₂). Cada gás desempenha um papel

específico na extensão da vida útil da carne e na manutenção de sua aparência (Gill, 1996; Sørheim et al, 1999):

- ?? CO₂, inibição do crescimento bactérias aeróbicas deteriorantes e seleção de bactérias lácticas;
- ?? O₂, manutenção das características de cor da carne;
- ?? N₂, inertização.

A possibilidade de aumento da vida útil de carnes frescas pela utilização de atmosfera modificada, pode permitir a centralização do processamento de moagem ou cortes em bifes e a distribuição em larga escala. A centralização destas operações promove a substituição da forma tradicional de distribuição de peças à vácuo pela comercialização de cortes previamente preparados e acondicionados em bandejas nas indústrias processadoras, sob inspeção federal, em uma embalagem padronizada e de melhor aparência que só será reaberta pelo próprio consumidor.

Para os varejistas, por sua vez, a centralização das operações de corte e embalagem e a possibilidade de aumento do tempo de estocagem de bifes pré-embalados, oferece consideráveis vantagens econômicas, tais como (Sarantópoulos, 1991):

- ?? diminuição nos custos de mão-de-obra: menos funcionários envolvidos em produção e embalagem, necessitando somente de repositor de mercadorias;
- ?? maior eficiência no gerenciamento dos estoques: permite manter em estoque só os produtos com maior potencial de venda e melhor lucratividade, sem o risco de deterioração, facilitando o gerenciamento de promoções;
- ?? eliminação das perdas com recortes, sebo e osso, e as quebras de desidratação;
- ?? unitização, que facilita a precificação das mercadorias
- ?? aumenta o espaço disponível para venda, não sendo mais necessária a sala de desossa e a instalação de equipamentos específicos para o manuseio de carnes.

A principal desvantagem dos sistemas em atmosfera modificada é o maior volume das embalagens ocupado pelo gás no espaço-livre e o aumento da probabilidade de furos na

embalagem durante a distribuição, quando comparados com a embalagem a vácuo (Jayasingh et al, 2001).

Nos Estados Unidos da América e na Europa a comercialização tradicional da carne fresca em bandejas de poliestireno expandido envoltas por filme de alta permeabilidade ao oxigênio tem sido profundamente influenciada pela evolução dos métodos de embalagem em atmosfera modificada. Novos formatos estão sendo desenvolvidos especificamente para permitir a centralização das operações de embalagem para a distribuição da carne fresca porcionada na bandeja pela indústria da carne (Belcher, 2006).

Comercialmente, o sistema de embalagem em atmosfera modificada mais utilizado para embalagem da carne fresca emprega altas concentrações de O₂ em combinação com CO₂, normalmente 60-80%O₂/20-40%CO₂ (Eilert, 2005). Nestes sistemas com altos níveis de oxigênio, a carne é acondicionada em bandejas rígidas constituídas por uma estrutura laminada de alta barreira a gases, termosseladas com filme de baixa permeabilidade ao oxigênio, no interior da qual é feita a injeção da mistura gasosa. Nas embalagens primárias, o oxigênio é importante, pois se combina com a mioglobina para manutenção da atrativa cor vermelha da carne fresca, tão apreciada pelo consumidor. A alta concentração de oxigênio aumenta a profundidade de penetração do gás, aumentando a camada superficial de oximioglobina (Hunt et al, 2004).

A profundidade da camada de oximioglobina é determinada pela pressão parcial do oxigênio (pO₂) no espaço-livre da embalagem e pode ser calculada a partir da equação:

$$x_{MbFe^{II}O_2} = \sqrt{\frac{2 \times C_0 \times D}{A_0}}$$

onde Co é a concentração total de oxigênio determinada pela pO₂, D é o coeficiente de difusão do O₂ e Ao é a taxa de consumo de oxigênio devido à atividade de enzimas endógenas (Møller & Skibsted, 2006).

Sistemas com altas concentrações de O₂ são utilizados, por exemplo, pela maior rede de varejo americana, a rede de supermercados Wal-Mart, que gradualmente eliminou de seus supermercados os açougues e salas de desossa em função da crescente preferência dos consumidores pelas carnes previamente embaladas pelos frigoríficos e expostas nos balcões de auto-serviço.

No entanto, esses sistemas com altos níveis de oxigênio, somente devem ser praticados quando o tempo de vida útil necessário for, seguramente, menor que duas semanas, uma vez que a oximioglobina se oxida a metamioglobina, após doze dias de estocagem à temperatura de 2°C (Gill & Jones, 1994b). Em temperatura de 6-8°C, a vida útil da carne em atmosferas com altos níveis de O₂ diminui para aproximadamente sete dias, sendo limitada neste caso, tanto pela deterioração microbiológica quanto pela descoloração (Sørheim et al, 1999). No caso da carne moída, este período de tempo pode ser ainda menor. Conceição (2002) observou uma significativa redução da cor vermelha da carne moída bovina proveniente dos músculos *Quadriceps femoris* ou *Semimembranosus*, *Adductor femoris* e *Gracilis* embalada em 80%O₂/20%CO₂ a partir do 3º dia de estocagem a 4 e 6°C.

Um período de estocagem 2 ou 3 vezes maior que o obtido com atmosferas com altos níveis de O₂ pode ser obtido, dependendo da temperatura de estocagem, com o sistema de embalagem de distribuição denominado comercialmente como *masterpack* em atmosferas de 100% N₂ ou 100% CO₂ (Venturini, 2004; Isdell et al 1999; Gill & McGinnis, 1995, Gill & Jones, 1994a; Gill & Jones, 1994b).

O *masterpack* é o sistema de embalagem comercial mais econômico disponível atualmente, mas deve ser combinado com um rigoroso controle de temperatura e a manutenção de uma atmosfera completamente livre de oxigênio para otimização da vida útil da carne (Jeremiah, 2001). Este sistema consiste de um saco confeccionado com filme co-extrusado de alta barreira aos gases, onde um certo número de bandejas convencionais é agrupado, e no interior do qual é feita a modificação da atmosfera. Nas embalagens de distribuição a carne é acondicionada em atmosfera livre de oxigênio, até a exposição ao varejo, quando então as bandejas são retiradas dos sacos e expostas ao ar atmosférico,

readquirindo a coloração vermelha típica de carne fresca, através da reoxigenação da mioglobina, fenômeno este conhecido como *reblooming*.

O tempo máximo de estocagem é alcançado quando a carne é acondicionada em atmosfera com 100% de dióxido de carbono e em temperatura de $-1,5^{\circ}\text{C}$ (próxima do congelamento), pois o efeito inibitório do dióxido de carbono ao crescimento microbiano aumenta com a diminuição da temperatura da carne.

Porém, na prática, é muito difícil obter uma atmosfera completamente livre de ar, utilizando-se os equipamentos comercialmente disponíveis para modificação da atmosfera. A manutenção de concentrações residuais de oxigênio favorece uma rápida formação de metamioglobina com cor marrom na superfície da carne (Gill, 1996). A formação de metamioglobina em baixíssimas concentrações de oxigênio é um problema que afeta a aparência da carne embalada sob CO_2 , porque a oxidação da deoximioglobina à metamioglobina é mais rápida que a oxidação da oximioglobina (Gill, 1996). Uma vez produzida, a metamioglobina pode ser reconvertida a deoximioglobina através da atividade de enzimas ou cofatores presentes no tecido muscular (O’Keeffe & Hood, 1982). No entanto, a atividade redutora é limitada e diminui ao longo da estocagem. Quando o potencial de oxi-redução é esgotado, a descoloração torna-se irreversível. Portanto, do ponto de vista prático, o ar deve ser eficientemente removido da embalagem e substituído por um volume de CO_2 suficiente para saturar a carne e manter-se em equilíbrio ao redor do produto, otimizando assim o seu efeito antimicrobiano (Gill & Penney, 1988).

Como os tecidos musculares diferem em sua habilidade de seqüestrar o oxigênio da atmosfera e reduzir a metamioglobina formada na superfície da carne (Hunt et al, 2004), a variabilidade intermuscular é o principal fator que determina a estabilidade da cor dos sistemas de embalagem em atmosferas livres de oxigênio. A concentração de oxigênio e a temperatura de estocagem também podem afetar a ocorrência e a duração da descoloração. Gill e McGinnis (1995) observaram que bifes de contrafilé estocados sob residual de oxigênio menor que 0,04% e a $-1,5^{\circ}\text{C}$ apresentaram menores frações de metamioglobina do que quando estocados em temperaturas superiores. Em contrapartida, nos bifes de filé-mignon que possui baixa estabilidade de cor, a mioglobina oxidou-se irreversivelmente mesmo em concentrações de oxigênio relativamente menores ($<0,01\text{ppm}$), independente da

temperatura de estocagem. Em geral, recomenda-se um residual de oxigênio de no máximo 0,1% e, preferencialmente, não mais que 0,05% para prevenir a descoloração (Gill, 1996).

Uma possível solução para se evitar a rápida descoloração que ocorre sob concentrações residuais de oxigênio é a inclusão de sachês absorvedores de oxigênio, no interior das embalagens secundárias ou primárias, capazes de manter a concentração de oxigênio abaixo dos limites críticos para a oxidação da mioglobina (Venturini, 2003; Tewari et al, 2001; Gill, 1996).

No entanto, para que não ocorra a descoloração em sistemas livres de oxigênio, a taxa de remoção do oxigênio pelo agente oxidante presente no absorvedor, geralmente ferro inorgânico, deve ser mais rápida do que a da absorção pela própria carne (Gill, 1996).

Como a velocidade de seqüestro do oxigênio pelos absorvedores disponíveis comercialmente diminui exponencialmente com o decréscimo da concentração de oxigênio, é necessário o uso de um grande número de absorvedores de oxigênio por embalagem, para se atingir um residual de O_2 de no máximo 0,1% imediatamente após a termoselagem, o que pode ser impraticável economicamente (Brandon, Butler & Allen, 2003; Tewari et al, 2001; Gill, 1996; Smith, Abe & Hoshino., 1995).

A adição de baixas concentrações de monóxido de carbono (CO), pode eliminar os problemas de descoloração da carne estocada em atmosfera livre de oxigênio, por períodos prolongados, restaurando a cor vermelha através da formação de uma forte ligação com característica parcialmente iônica com o íon ferroso da mioglobina (Møller & Skibsted, 2006), conforme pode ser observado na Figura 2. Essa reação é limitada a uma fina camada superficial que corresponde à profundidade da penetração do CO (Hunt et al, 2004).

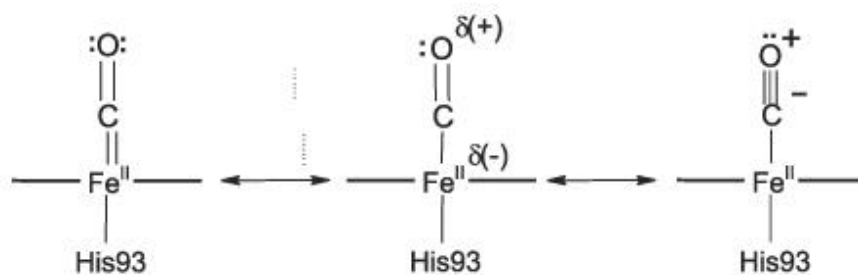


Figura 2. Distribuição eletrônica simplificada para o complexo formado entre o estado ferroso da mioglobina e monóxido de carbono (Møller & Skibsted, 2006).

A principal função do CO em baixas concentrações é estabilizar a cor vermelha da carne através da formação da carboximioglobina (Hunt et al, 2004; Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999; Kropf, 1980). Este pigmento possui espectro de cor muito semelhante ao da oximioglobina formada durante a exposição da carne fresca ao oxigênio do ar atmosférico (Ramos, Fontes & Gomide, 2001). A diferença entre a carboximioglobina e a oximioglobina, é que a carboximioglobina é muito mais estável à oxidação na presença de CO₂ que a oximioglobina (Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999; Luño, Béltran & Roncalés, 1998).

Desde 1985 a indústria de carne da Noruega vem utilizando uma mistura gasosa de aproximadamente 0,3-0,5% CO, 60-70% CO₂ e 30-40% N₂ nas embalagens primárias de carne bovina, suína e de cordeiro (Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999). As embalagens com estas misturas gasosas representam cerca de 60% das vendas ao varejo de carne vermelha naquele país. Exemplos de diferentes misturas contendo CO para embalagem da carne estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de aplicações de monóxido de carbono (CO) em embalagem de carne fresca em atmosfera modificada (Sørheim, Aune & Nesbakken, 1997).

Composição da atmosfera modificada (%)				
CO	CO ₂	N ₂	O ₂	ar
2				98
1	50			
0,5-10		90-99,5		
1	51	18	30	
1	50	25	24	
1	20	9	70	
2	20	78		
1-5				95-99
100 ^a				
0,4	60	40		
0,3-0,4	60-70	30-40		

^aExposição antes da embalagem

Em 1997, Sørheim, Aune & Nesbakken. publicaram uma detalhada revisão sobre os aspectos tecnológicos, higiênicos e toxicológicos do uso de CO em atmosfera modificada para carne, e concluíram que o CO, em concentrações de 0,5%, além de conferir uma série de vantagens como o aumento da vida útil, estabilidade da cor e redução de custos, não representa nenhuma ameaça toxicológica para os consumidores. Esses mesmos autores concluíram também que em níveis abaixo de 1% o CO não representa nenhum perigo para o consumidor, porque o consumo do gás pela carne em tais concentrações de CO resulta em níveis desprezíveis de carboximioglobina na corrente sanguínea dos consumidores. Por exemplo, um adulto inala aproximadamente 15m³ de ar em 24h em atividade moderada, o equivalente a 0,625m³/h (ou 5m³ em 8h). Para prevenir que o nível máximo de COHb no sangue não exceda 1,5%, durante uma atividade física moderada por 1 hora, a concentração de CO no ambiente, não deve exceder 24mg/m³, ou 9,2mg/m³ em 8h. O consumo da carne tratada com 1% CO produz cerca de 0,1mgCO/kg carne após cocção (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre a exposição ao CO atmosférico e o consumo de carne embalada sob CO.

Estimativa dos níveis de CO no ambiente capaz de produzir 1,5% HbCO incluindo produção endógena			
Tempo de exposição	Concentração de CO no ar (mg/m³)		
	Em repouso	Atividade moderada	Trabalho intenso
15 min	170	80	52
30 min	86	42	29
1h	48	24	18
8h	11,5	9,2	9,2

Estimativa teórica de CO no sangue		
Método de exposição	Consumo de CO em 1h	Consumo de CO em 8h
Pulmões (15m ³ /dia)	24mg x 0,625 = 15,1mg	9,2mg x 5 = 46,0mg
Carne (250g) tratada com CO	0,025mg	0,025mg

No entanto, a inclusão de CO na atmosfera modificada para carne é objeto de controvérsia. Uma possível desvantagem do uso do CO para a embalagem da carne é o mascaramento das condições microbiológicas, uma vez que a cor vermelha da carboximioglobina se mantém estável a despeito da pobre qualidade microbiológica da carne (Kropf, 1980).

O trabalho de Jayasingh et al (2001) reflete essa preocupação. O autor concluiu que a altíssima estabilidade da cor da carne moída acondicionada sob 0,5% de CO pode exceder a vida útil microbiológica, com risco de mascarar a deterioração da carne ($>10^6$ UFC/g) após 5 semanas de estocagem, a 2°C.

É importante ressaltar aqui que o CO em baixas concentrações tem pouco ou nenhum efeito sobre as condições microbiológicas da carne (Sørheim et al, 1999). Portanto, a combinação de baixos níveis de CO com um gás bacteriostático como o CO₂, é fundamental para conservação microbiológica da carne.

Quando a quantidade de CO₂ adicionada for suficiente para saturar a carne à pressão atmosférica, as bactérias lácticas tornam-se os microrganismos predominantes (Gill, 1988), e uma extensa fase *lag* e um aumento no tempo de geração são impostos aos fungos e outras bactérias (Gill & Penney, 1988). Em concentrações entre 5 e 20%CO₂, o principal efeito é sobre a fase *lag*. Em concentrações superiores o grau da inibição aumenta com a

diminuição da temperatura (Sørheim et al, 1999; Nissen et al, 1996). Bifes de alcatra e contrafilé acondicionados com absorvedores de oxigênio em atmosfera modificada com 100%CO₂ a 2°C apresentaram vida útil de 35 e 42 dias, respectivamente (Venturini, 2003).

A microbiota da carne acondicionada sob uma mistura gasosa contendo 0,4%CO/60%CO₂/40%N₂ à 2°C foi predominantemente dominada por bactérias láticas, enquanto que a contagem de bactérias tipicamente deteriorantes, tais como *Brochothrix thermosphacta*, bem como de *pseudomonas* foram consideravelmente reduzidas sob condições anaeróbicas (Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999).

Segundo Gill & Jones (1994b), o desenvolvimento de aroma levemente ácido produzido pelas bactérias láticas, sob condições anaeróbicas, só é detectável quando a contagem é próxima ou superior a 5 ciclos logarítmicos, enquanto que o odor pútrido ou azedo é observável somente quando o número de bactérias aeróbicas é igual ou superior a 6 ciclos logarítmicos.

Luño, Béltran & Roncalés (1998) mostraram que atmosfera contendo 50% de dióxido de carbono, 1% de CO, na presença de baixas concentrações de oxigênio (24%) foi capaz de prolongar a vida útil de carne bovina por 29 dias a 1?1°C. Esses autores concluíram que esta mistura gasosa combina uma série de efeitos desejáveis para a estocagem prolongada da carne em atmosfera modificada como a inibição do crescimento de bactérias aeróbicas deteriorantes e patógenos anaeróbios e a estabilização da cor vermelha típica de carne fresca, além da manutenção do aroma.

Posteriormente Sørheim et al (1999) reportaram que com o uso de CO na atmosfera modificada, torna-se dispensável a adição de oxigênio. Segundo Seyfert et al. (2007) a inclusão de 20 ou 80% de oxigênio não tem nenhum impacto sobre a cor da carne embalada sob 0,4%CO. Acredita-se que o CO possa ser incapaz de dissociar o oxigênio ligado à mioglobina e que, portanto, a carboximioglobina somente pode se formar quando o CO se liga à mioglobina original (Mancini & Hunt, 2005).

A autorização do uso de monóxido de carbono (0,4%) na embalagem primária pela FDA foi considerada uma importante ruptura de paradigma a cerca da embalagem de carne fresca (Eilbert, 2005).

Em fevereiro de 2002, a Food and Drug Administration (FDA) autorizou a *Pactiv Corporation*, o uso de CO em um sistema para pré-tratamento da carne fresca, denominado ActiveTech[?] 2001. Neste sistema, uma mistura gasosa contendo <0,4%CO é injetada no interior de uma embalagem secundária de alta barreira, tipo *masterpack*, contendo bandejas com carne envoltas em filmes de altíssima permeabilidade ao O₂ que são retiradas da atmosfera contendo CO, imediatamente antes da exposição para a venda no varejo. Um absorvedor de oxigênio é adicionado no interior da embalagem secundária para garantir a remoção do oxigênio residual. O ponto chave deste sistema, segundo Sørheim (1999), é que a insignificante quantidade residual de CO presente no produto final não tem nenhum efeito funcional na carne exposta para a venda. Este pesquisador afirma que, quando as bandejas são removidas da embalagem secundária e expostas ao ar atmosférico, a cor da carne se altera numa taxa similar a da carne sem CO excluindo, portanto, o risco de mascarar a deterioração microbiológica.

A partir de 2003 a autorização de uso de CO foi estendida para a embalagem primária (bandeja) a outras duas indústrias de carne, a *Precept Foods LLC*: uma *joint venture* entre *Cargill Meat Solutions Corp.* e *Hormel Foods Corp.*(pioneiras nesta tecnologia) e a *Tyson Foods, Inc.*. Esta última empresa recentemente inaugurou uma planta no Texas avaliada em 100 milhões de dólares para produzir carne fresca pré-embalada em bandejas em atmosfera modificada, em larga escala (Weiss, 2006).

Recentemente, a Kalsec Foods, travou uma batalha comercial ao protocolar petição junto ao FDA solicitando a proibição do uso de monóxido de carbono, alegando tratar-se de um corante capaz de mascarar a deterioração da carne, enganando os consumidores, que consideram a cor como principal critério para decisão na hora da compra. O FDA se defende afirmando que a prática é segura e que a carboximioglobina formada pela ligação entre o monóxido de carbono e a mioglobina não pode ser definida como corante (Sebranek et al, 2006).

Apesar da recente oposição em relação ao uso do CO, estima-se que o mercado de carne fresca pré-embalada em atmosfera modificada continuará crescendo, prometendo revolucionar a comercialização da carne fresca (Eilbert, 2005).

A adoção de variações da tecnologia de embalagem da carne fresca em atmosfera modificada demonstra a complexidade e a contínua evolução dentro da indústria de carne.

Para beneficiar-se dos novos processos e desenvolvimento de produtos e assegurar que mudanças futuras não comprometem a qualidade ou segurança, a indústria da carne deve investir na pesquisa em ciência e tecnologia.

Referências Bibliográficas

AMSA Guidelines for meat color evaluation. In: 44th ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE American Meat Science Association, 1991, Manhattan. **Proceedings...** Manhattan: National Live Stock and Meat Board.

ANUALPEC 2004: **Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo**, 10^aed, FNP Consultoria & Comércio, 400p.

BELCHER, J.N. Industrial packaging developments for the global meat market. **Meat Science**, v.74, p.143-148, 2006.

BRANDON, K.; BUTLER, F.; ALLEN, P. The rate of oxygen absorption of four commercially available oxygen scavengers at refrigerated temperatures. In: 49th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY. 2003, Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), p.511-512

BRODY, A.A. Action in active and intelligent packaging. **Food Technology**, v.56, n.2, p. 70-71, 2002.

CONCEIÇÃO, M.P.J. **Avaliação de sistemas de embalagem e condições de comercialização de carne bovina moída em atmosfera modificada**. Campinas, 2002, 116p. Tese (doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas.

EILERT, S.J. New packaging technologies for the 21st century. **Meat Science** v.71, p.122-127, 2005.

FELÍCIO, P.E. de Sistemas de qualidade assegurada na cadeia de carne: a experiência brasileira. In: 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES. 2001, São Pedro: Centro de Tecnologia de Carnes - ITAL, p.342-353.

GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**, v.43, p.99-109, 1996.

GILL, C.O.; JONES, T. The display of retail packs of ground beef after their storage in master packages under various atmospheres. **Meat Science**, v.37, p.281-295, 1994a.

GILL, C.O.; JONES, T. The display of retail-packaged beef steaks after their storage in master packages under various atmospheres. **Meat Science**, v.38, p.385-396, 1994b.

GILL, C.O.; MCGINNIS, J.C. The effects of residual oxygen concentration and temperature on the degradation of the colour of beef packaged under oxygen-depleted atmospheres. **Meat Science**, v.39, p.387-394, 1995.

GOVINDARAJAN, S. Fresh meat color. *Food Science and Nutrition*, v.4, p.117-140, 1973.

HOOD, D.E.; MEAD, G.C. Modified atmosphere storage of fresh meat and poultry In: PARRY, R.T.(Ed.) Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods. New York: Blackie Academic & Professional, 1993, cap.11, p. 269-294.

HUNT, M.C.; MANCINI, R.A.; HACHMEISTER, D.H.; KROPP, D.H.; MERRIMAN, M.; DELDUCA, G.; MILIKEN, G. Carbon monoxide in modified atmosphere packaging affects color, shelf life, and microorganisms of beef steaks and ground beef. **Food Chemistry and Toxicology**, v.69, n.1, p.45-52, 2004.

HUTCHINGS, J.B. Chemistry of food colour. In: Food Colour and appearance. Cambridge: Blackie Academic & Professional, 1994. Capítulo 10, p.401-410: Fresh meat.

ISDELL, E.; ALLEN, P.; DOHEERTY, A.M.; BUTLER, F. Colour stability of six beef muscles stored in a modified atmosphere mother pack system with oxygen scavengers. **International Journal of Food Science and Technology**, v.34, p.71-80, 1999.

JAYASINGH, P.; CORNFORTH, D.P.; CARPENTER, C.E.; WHITTIER, D. Evaluation of carbon monoxide treatment in modified atmosphere packaging or vacuum packaging to increase color stability of fresh beef. **Meat Science**, v.59, p.317-324, 2001.

LUÑO, M.; BELTRÁN, J.A.; RONCALÉS, P. Shelf-life extension and colour stabilisation of beef packaged in low O₂ containing CO: loin steaks and ground meat. **Meat Science**, v.48, p.75-84, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO Portaria nº 145, de 1 de setembro de 1998. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1274>>. Acesso em: 19 ago 2007

MØLLER, J.K.S.; SKIBSTED, L.H.. Myoglobins: the link between discoloration and lipid oxidation in muscle and meat. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1270-1278, 2006.

NISSEN, H.; ALVSEIKE, O.; BREDHOLT, S.; HOLCK, A.; NESBAKKEN, T. Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.211-220, 2000.

O'KEEFFE, M.; HOOD, D.E. Anoxic storage of fresh beef: nitrogen and carbon dioxide storage atmospheres. **Meat Science**, v.5, p.27-39, 1981b.

RAMOS, E.M.; FONTES, P.R.; GOMIDE, L.A.M. Determinação de pigmentos heme na superfície de carnes tratadas com monóxido de carbono usando reflectância. In: 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES. 2001, São Pedro: Centro de Tecnologia de Carnes - ITAL, p.207-208.

SØRHEIM, O.; AUNE, T.; NESBAKKEN, T. Technological, hygienic and toxicological aspects of carbon monoxide used in modified-atmosphere packaging of meat. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, p.307-312, 1997.

SØRHEIM, O.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide **Meat Science** v.52 p.157-164, 1999.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L. Embalagem a vácuo e com atmosfera modificada para carnes frescas. In: **Embalagens para produtos cárneos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1991. Cap. 1, p. 1-20.

SMITH, J.P.; ABE, Y.; HOSHINO J. Interactive packaging involving sachet technology. In: ROONEY, M.L. **Active Food Packaging**, London: Blackie Academic & Professional, 1995. Cap. 6, p.143-172.

TEWARI, G.; JAYAS, D.S.; HOLLEY, R.A. Centralized packaging of retail meats-cuts: a review. **Journal of Food Protection**, v.62, n.4, p.418-425, 1999.

TEWARI, G.; JAYAS, D.S.; JEREMIAH, L.E.; HOLLEY, R.A. Prevention of transient discoloration of beef. **Journal of Food Science**, v.66, n.3, p.506-510, 2001.

VANDERZANT, C.; SPLITTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3^a.edição. Washington: American Public Health Association, 1992.

VENTURINI, A.C. **Embalagens de distribuição (*masterpack*) com atmosfera modificada e absorvedores de oxigênio para aumento da vida útil de carne bovina**. Piracicaba, 2003, 103p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP).

VENTURINI, A.C.; CONTRERAS, C.J.C.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; CIPOLLI, K.M.V.A.B.; ARIMA, H.K The effects of oxygen scavengers on the colour stability of fresh beef meat packaged under pure carbon dioxide atmosphere In: 49th INTERNATIONAL CONGRESSOF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003, Campinas: **Proceedings...** Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), p. 509-510.

WEISS, Rick FDA Is Urged to Ban Carbon-Monoxide-Treated Meat. Washington Post, Washingto, 20 jan. 2006. p. A01

CAPÍTULO 2

Microbiological, Color and Sensory Properties of Fresh Beef Steaks in Low Carbon Monoxide Concentration with or without Oxygen

Abstract

Steaks from *Gluteus medius* (GM) and *Longissimus dorsi* (LD) were packaged in atmospheres containing low levels of carbon monoxide (0.2 or 0.4%) in combination with (21%) or without oxygen. The other components of the MAP systems were carbon dioxide (30%) and nitrogen (balance). Steaks were evaluated on 0, 7, 14 and 21 days of retail display at about 2°C. Steaks packaged without oxygen retained a desirable color and practically did not present a visible discoloration or perceptive off-odor along the entire display time, regardless the CO concentration. Browning was evident in the GM steaks packaged aerobically in 0.2%CO, where an area around 10-20% became visible from the 14th day of storage and reached ~60% of the steaks after 21 days. As to the GM or LD samples stored aerobically in 0.4%CO, discoloration became apparent (~20%) only after 21- day storage in MAP. The perception of a moderately bad odor only occurred in the samples packaged in 21% oxygen, at the 21st day of display at 2°C, when the number of aerobic psychrotrophic microorganisms was higher than 7 log UFC/g.

Keywords: Beef steaks, case-ready, modified atmosphere packaging, carbon monoxide.

1. Introduction

The addition of low concentrations of carbon monoxide (CO) can eliminate the problems with the discoloration of beef stored in virtually oxygen-free atmospheres for lengthened periods, restoring the bloomed color through the interaction of CO with myoglobin (Hunt *et al.*, 2004).

The main function of CO at low concentrations is to stabilize the bloom-red color of meat by forming a strong bond with the ferric ion of the myoglobin and the carboxymyoglobin formation (Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999). This reaction is limited to a thin surface layer that corresponds to the depth of CO penetration (Jayasingh *et al.* 2001; Hunt *et al.*, 2004). This pigment has an absorption spectra nearly identical to that of oxymyoglobin formed during the exposure of the fresh beef to the oxygen of atmospheric air (Seyfert *et al.*, 2007). The difference between carboxymyoglobin and oxymyoglobin is that the former is more stable to oxidation than the latter (Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999; Luño, Béltran & Roncalés, 1998).

Since 1985, the beef industry of Norway has been using a gas mixture of about 0.3-0.5% CO, 60-70% CO₂, and 30-40% N₂ in the primary packages of beef, pork and lamb (Sørheim *et al.* 1999). The packages with this gas mixture represent around 60% of the beef retail sold in that country.

Sørheim, Aune & Nesbakken (1997) published a detailed review of the technological, hygienic and toxicological aspects of the use of CO in modified atmosphere in beef and concluded that 0.5%CO, not only provides several advantages, such as the increase of shelf

life, color stability and cost reduction, but also does not represent any toxicological threat for consumers. However, the use of carbon monoxide for MAP of meat was prohibited in Norway since 2004, due implementation of European Union food regulations (John *et al.*, 2005).

On the other hand, the USDA and FDA approved in 2002 the use of 0.4% carbon monoxide in an anaerobic MAP master packaging system with 30%CO₂ and the balance as N₂ (Hunt *et al.* 2004). Similar use has also been approved in New Zealand and Australia where CO is considered a processing aid (Wilkinson *et al.*, 2006). Further GRAS approval was registered in the US in 2004 for the addition of CO to primary packaging systems, in which the MAP mixture is flushed directly into the meat-containing tray (Seyfert *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2006).

A possible disadvantage of using CO in beef packaging is the masking of the microbiological deterioration, since the red bloom color of carboxymyoglobin keeps stable despite the poor microbiological quality of the beef (Hunt *et al.*, 2004). The work of Jayasingh *et al.* (2001) reflects this concern. The author concluded that the high color stability of ground beef packed in 0.5% of CO could exceed the microbiological shelf life, with the risk of masking the beef deterioration ($>10^6$ CFU/g) after 5-week storage at 2°C.

Oxygen is injected, not only to inhibit anaerobic growth, but also to obtain carboxymyoglobin and oxymyoglobin mixtures in an attempt to maintain the natural color of the beef (Luño *et al.*, 2000).

Although previous researches have already been developed concerning the sensorial and microbiological aspects of beef in low CO concentration, the benefits and the disadvantages of packaging with or without oxygen have still not been sufficiently clear.

Luño *et al.* (1998) used 1% CO with 24 and 70% oxygen to lengthen the shelf life of fresh beef steaks and ground beef for 29 days at 1±1°C. Luño *et al.* (2000) showed that in atmospheres containing 24% oxygen and 50% CO₂, at least 0.5% CO was needed to associate color optimization and the microbiological safety of fresh steaks using modified atmosphere packaging. On the other hand, Seyfert *et al.* (2007) showed that addition of 0.4% CO to package atmospheres with 20 or 80% oxygen had no impact on color stability of fresh steaks stored at 0.2±3°C.

The aim of this work was to investigate color, microbiology and off-odor interrelations in order to increase the stability of fresh beef steaks by 21 days at 2°C, using a low level of CO in primary packages with or without oxygen.

2. Materials and Methods

2.1. Raw materials

M. Gluteus medius (GM) and *M. Longissimus dorsi* (LD) with normal pH (<5.8) were randomly removed from twenty market-weight carcass of Nelore-cross bulls, at a commercial abattoir (Marfrig Slaughterhouse, Promissão, SP-Brazil). The muscles were obtained 72h post-slaughter from castrated males raised in open *Brachiaria brizantha* pasture at the age of 24 month old (with 2 incisive teeth and 1-3 mm fat layer).

2.2. *Packaging*

Two steaks of about 250g (1.5cm thickness) were placed into laminated thermoformed polyester/polyethylene trays (24.2x171x45mm, Emplal Embalagens Plásticas Ltda., Carapicuíba, SP-Brazil). The steaks were placed on a pad with nominal absorbency of 100mL of liquid (Dri-loc[®], Cryovac[®], Sealed Air, São Paulo, SP-Brazil).

The codified trays were placed in moulds of a thermosealing machine equipped with a vacuum pump (Smart 500, ULMA Packaging Ltda., São Paulo-SP) and automatic control of the vacuum/injection/cutting cycle of the cover film.

The trays were sealed with a laminated film with a polyethylene (LLDPE) sealant layer, polyamide (PA) outer layer and ethylene-vinyl alcohol (EVOH) barrier layer. The laminated film has a total nominal thickness of 102 μ m, oxygen permeability of 3.0cm³/m²/24h at 23°C, 0% of relative humidity (RH) and permeability rate to water vapour of 7g/m²/24h at 38°C, 90% RH (T6140BA, Cryovac[®], Sealed Air, São Paulo-SP). Considering that the permeability of O₂:CO₂ is around 1:4 (Jakobsen & Bertelsen, 2004), the film permeability to CO₂ can be estimated at approximately 12 cm³/m²/24h at 23°C and 0% RH.

Altogether 224 trays were processed and were randomly divided into four experimental lots of 28 units per cutting. In each lot, denominated T₁, T₂, T₃ and T₄, a gas mixture of 30% CO₂ and variable concentrations of CO, O₂ and N₂, were injected as Table 1. Two trays of each lot remained unpackaged for initial analyses (0 d).

Table 1
Modified atmosphere packaging (MAP) treatments

MAP treatment	Headspace gas composition (%)			
	CO	O ₂	CO ₂	N ₂
T ₁	0.2	0	30	69.8
T ₂	0.4	0	30	69.6
T ₃	0.2	21	30	48.8
T ₄	0.4	21	30	48.6

The gas composition of the cylinders was made and certificated by AGA (Linde Group).

A self-activated oxygen-absorbing sachet (FT200, O-Buster[®]; Hsiao Sung Non-Oxygen Chemical Co., Ltd., Taiwan) was placed in the trays with treatments T₁ and T₂ (without oxygen). Each sachet had a nominal absorption capacity of 200cm³ of residual O₂ in the head space of the package. This absorber was used to prevent an irreversible darkening of the beef due to the quick formation of brown metmyoglobin that can occur on the surface of the beef exposed to residual concentrations of oxygen (Tewari, Jayas, Jeremiah & Holley, 2001; Isdell, Allen, Doherty & Butler, 1999; Gill & McGinnis, 1995). The thermosealed trays were placed in plastic distribution boxes and transported in refrigerated truck at 4°C to the pilot meat plant of the Agroindustry, Food and Nutrition Department of ESALQ in Piracicaba, where they were stored under controlled temperature (2±2°C) for the evaluation of the shelf life of the products.

2.3. Analyses description

The following analyses were carried out on the day of the steaks processing (day=0), and periodically after 7, 14 and 21-day storage in MAP at 2°C.

2.3.1. pH evaluation

The pH of the steaks was measured directly on the beef surface by a pulsing electrode (DM2, Digimed, São Paulo, SP-Brazil) coupled to a calibrated portable pH meter (Oakton® Waterproof pH 300 Meter, Oakton[?] Instruments, Vernon Hills, IL). The samples were analyzed in replicates and the mean value was obtained from four measures per sample.

2.3.2. Gas composition

The carbon dioxide gas and oxygen concentrations in the head space of the trays were evaluated after the sealing of the trays in the slaughterhouse (day=0) and at all storage periods, immediately before the opening of the packages for the microbiological and color (sensorial and instrumental) evaluations.

The gas concentration measures were carried out using a portable analyzer (CheckPoint®, PBI Dansensor A/S, Ringsted, Denmark). The gas mixture of the head space was collected with a hermetic syringe through a rubber septum attached to the surface of the top film of the tray. The analyses were carried out in all the trays (four trays for each treatment) and the mean values were expressed in percentages of CO₂ and O₂ (v/v).

2.3.3. Microbiological analysis

The microbiological characterization of the raw material to be stored in MAP was carried out on the day of processing (LD and GM steaks production), before the packing in the trays. Two samples were analyzed per beef cutting. Adequate serial decimal dilutions were prepared and each sample was plated in replicates. The numbers of aerobic and anaerobic psychrotrophic bacteria, enterobacteria, lactic acid bacteria, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, sulphite-reducing *Clostridia* and *Brochothrix thermosphacta* were expressed in log CFU/cm² and were incubated according to the methods described by Downes & Ito (2001)

2.3.4. Sensory analysis

Twelve panelists familiarized with sensory tests were trained before the beginning of the preliminary tests. Five training sessions were carried out to make the panelists familiar with the attributes and scales used according to the training method suggested by Meilgaard, Civille & Carr (1987).

In the beginning, the sensory attributes were evaluated using the scales suggested by AMSA (1991), but during the sessions the scales were adjusted according to the panelists suggestions. At the end of each storage period, the trays were randomly removed from the cold chamber for the sensory evaluation. Replicates were carried out by sampling the trays. The visual color of the steaks was evaluated on a unstructured 9-cm scale as follows: 0 cm = brown; 5.0 cm = dark red; 9.0 cm = bright red. Surface discoloration was scored on a five-

point scale, where 1 = 61-100%, 2 = 21-60% discoloration, 3 = 11-20% discoloration, 4 = 1-10% discoloration and 5 = 0% discoloration. The panelists were asked to categorize the immediate off-odor as: 1 = extreme off-odor; 2 = moderate off-odor; 3 = small off-odor; 4 = slight off-odor and 5 = no off-odor. Fat appearance were also evaluated in LD steaks: 1 = very strongly disagree; 2 = disagree; 3 = no opinion; 4 = agree; 5 = very strongly agree

2.3.5. Instrumental color

The instrumental color was measured on the beef surface immediately after the opening of the tray, using a portable MiniScan[®] XE Plus spectrophotometer (Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA) connected to a computer equipped with the Universal Software V4.10 system. The spectrophotometer was calibrated according to the manufacturer's recommendations and standardized to operate with the following specifications: optical geometry 45/0, 25mm opening diameter, observation angle of 10° and illuminant D65. The CIE L*a*b* coordinates, chrome values ($C^* = [(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$) and hue angle ($h^* = \text{tg}^{-1}(b^*/a^*)$) of the samples were obtained by the machine movement, in four adjacent positions, so that the whole available surface of the steaks was sampled. The spots found were visually described.

The measures determination were carried out directly on the beef surface, avoiding an excessive compression that would project the sample surface out of the detector plan used for calibration.

2.3.6. Statistical analysis

The experiment was a 4 x 4 x 2 x 2 factorial design with four packaging treatments (T₁: 69.8 %N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO; T₂: 69.6 %N₂ / 30%CO₂ / 0.4%CO; T₃: 48.8 %N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO / 21%O₂; T₄: 48.6 %N₂ / 30%CO₂ / 0.4%CO / 21%O₂), four storage times at 2°C (0, 7, 14 and 21 days), two muscles (*M. Gluteus medius* and *M. Longissimus dorsi*) and two replications of entire experiment. Means of the treatments were calculated by the analysis of variance (ANOVA) using Statistica[®] software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Significant differences among the means were determined by calculation of Tukey Test, when appropriate. The significance level used for all statistic analyses was 5%.

3. Results and Discussion

Table 2 summarizes the results of the analysis of variance (ANOVA) of the GM and LD steaks, respectively.

Table 2

Main and interaction effects of packaging atmosphere with different %O₂, %CO and storage time on pH, gas composition, instrumental color and sensory panel scores of fresh steaks stored at 2? 1°C.

Effect	Steaks	pH	%O ₂	%CO ₂	L*	C*	h*	visual color	% discolor	off-odor	fat appearance
O ₂	GM	*	*	*	*	*	*	*	*	*	nd
CO		*	ns	*	ns	ns	ns	*	*	*	nd
time		*	ns	*	*	*	*	*	*	*	nd
O ₂ x time		*	ns	ns	ns	*	*	*	*	*	nd
CO x time		*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	nd
O ₂ x CO x time		*	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	nd
O ₂	LD	*	*	*	*	*	ns	*	*	*	*
CO		ns	*	ns	*	*	ns	*	ns	ns	ns
time		*	*	ns	*	*	*	ns	*	*	*
O ₂ x time		ns	*	*	ns	*	*	*	*	*	*
CO x time		*	*	ns	ns	ns	ns	*	*	ns	*
O ₂ x CO x time		ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

*significant at p<0.05. ns = not significant. nd=not determined

L*=lightness; C* = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$; h*: arc tan(b*/a*)

0 cm = brown; 5.0 cm = dark red; 9.0 cm = bright red.

1 = 61-100%, 2 = 21-60% discoloration, 3 = 11-20% discoloration, 4 = 1-10% discoloration and 5 = 0% discoloration.

1 = extreme off-odor; 2 = moderate off-odor; 3 = small off-odor; 4 = slight off-odor and 5 = no off-odor.

1 = very strongly disagree; 2 = disagree; 3 = no opinion; 4 = agree; 5 = very strongly agree

3.1 pH

Initially, the GM and LD steaks presented initial pH of 5.50?0.14 and 5.54?0.06, respectively.

Although all products had a normal pH (5.5-5.8) over the entire storage time (21 days), the pH values were significantly affected by oxygen concentration and storage time ($p<0.05$).

On average, the samples stored without oxygen (T₁: 69.8%N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO and T₂: 69.6%N₂ / 30%CO₂ / 0.4%CO) presented pH values lower than the samples stored

with oxygen (T₃: 48.8 %N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO / 21%O₂ and T₄: 48.6 %N₂ / 30%CO₂ / 0.4%CO / 21%O₂).

These slight differences in the pH can be related to the concentration of CO₂ in the head space of the packages, once the samples with the lowest pH values presented the lowest CO₂ concentrations in the headspace. This effect can be related to the dissolution of CO₂ in the water of meat and/or activity of Lactobacilli bacteria (Rousset & Renerre, 1991).

3.2 Gas composition

During the beef storage in modified atmosphere, O₂ and CO₂ concentrations were progressively altered. O₂ and CO₂ were dissolved in the meat (Jayasingh *et al.*, 2001) or reduced due to measurable permeability of package materials used in this experiment.

The presense of oxygen in modified atmosphere affected significantly the CO₂ concentration ($p < 0.05$). The samples stored in 21% oxygen such as T₃: 48.8 %N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO / 21%O₂ and T₄: 48.6 %N₂ / 30%CO₂ / 0.4%CO / 21%O₂, presented higher CO₂ concentrations after the 14th day of storage than the samples in anoxic atmospheres, T₁: 69.8 %N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO or T₂: 69.6 %N₂ / 30%CO₂ / 0.4%CO. On the 21st day of storage, the mean content of CO₂ in the head space of the trays under 21% O₂ was similar to the one injected on the processing day of the experimental lot (28.3%), whereas, in the samples stored in anoxic atmosphere, the mean content of CO₂ was significantly lower, reaching 19.91% on the 21st day of storage ($p < 0.05$).

Considering that the absorption of O₂ by the beef is stabilized along the first days of storage (Jakobsen, 2003), the most pronounced microbiological metabolism in the final period of storage was supposed to be the main reason for the changes in O₂ and CO₂ concentrations observed between the 14th and 21st day of storage when a slight increase in the CO₂ concentration and a decrease in the O₂ content was observed. Thus, oxygen consumption and CO₂ production by aerobic psychrotrophic microorganisms affected the results in this period when the numbers reached about 10⁷ CFU/g.

Although there is a controversy about an optimal CO₂ amount for the maximum microbial inhibition, many studies agree that a concentration of 20-30% in the headspace is enough to reduce significantly the growth of deteriorating aerobic bacteria (Sørheim, Ofstad & Lea, 2004; Luño, Béltran & Roncalés, 1998; Gill, 1996).

However, it is important to point out that the bacteriostatic effect of CO₂ is related to the gas absorption capacity of the meat, and not to its concentration in the headspace of the package. Adopting a practical point of view, the optimization of the bacteriostatic effect is reached when the amount of injected CO₂ is higher than that requested to saturate the beef and keep CO₂ in balance in the head space of the package. The optimum level of CO₂ has been reported to be 2 L/kg of meat (Jeremiah, Gibson & Arganosa, 1996; Penney & Bell, 1993), 1–2 L/kg of meat (Gill & Penney, 1988) and 1–1.5 L/kg of meat (Shay & Egan, 1987). The saturation is necessary to keep the gas concentration in balance and optimize the bacteriostatic effect (Jakobsen & Bertelsen, 2004).

In this experiment this ratio varied from 1.21 to 0.85 L/kg of meat in the samples without oxygen and from 1.21 to 1.01 L/kg of meat in samples stored with oxygen, evidencing that a balance in pressure was not achieved. Sorheim et al (1999) achieved an initial gas volume to meat weight ratio in the trays of approximately 1.5 to 1. The need for a relatively large volume of atmosphere in sealed trays conflicts with storage requirements, as a small piece of meat in a large pack reduces the amount of product that can be exposed in a given display area and gives the appearance of over-packaging. Thus, in practice, sealed trays are often formed with a headspace far less than that required for optimum preservation of the product (Gill, 1996).

The atmosphere in the headspace of the packages placed in virtually oxygen-free atmosphere (T_1 and T_2) presented variable fractions of residual oxygen (0.1 to 0.9%) immediately after the thermosealing of the packages, showing the practical impossibility of performing a complete evacuation of the system with commercially available equipment.

The formation of metmyoglobin (brown) in residual concentrations of oxygen is a problem that affects the beef appearance in anoxic atmospheres, due to the quick oxidation of deoxymyoglobin to metmyoglobin (Venturini *et al.*, 2006; Hunt *et al.*, 2004; Jayasingh *et al.*, 2001). At sealing, the pack atmosphere can have a residual oxygen concentration of no more than 0.1 per cent, and preferably no more than 0.05 per cent to minimize such discoloration (Gill, 1996).

To eliminate residual oxygen, fast-action oxygen-absorber sachets were added to the trays where oxygen-free mixtures were injected. Thus, along the storage period, the residual

concentration of oxygen decreased and reached zero between the 2nd and the 7th day, remaining stable throughout all the subsequent periods. Hence, the residual oxygen may have been 'kidnapped' by the action of the oxygen absorbers associated to these mixtures, or by the bacterial activity evidenced in the final periods of storage.

3.3 Microbial evaluation

3.3.1. Microbial quality of GM and LD pieces used for the steaks processing

The Figures 1-4 show the results of the microbial analysis of the GM and LD steaks after conventional deboning (0 day) and the storage time effect in MAP on the microbiota. The results were satisfactory, according to the legal standards concerning fresh beef determined by Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA, 2001).

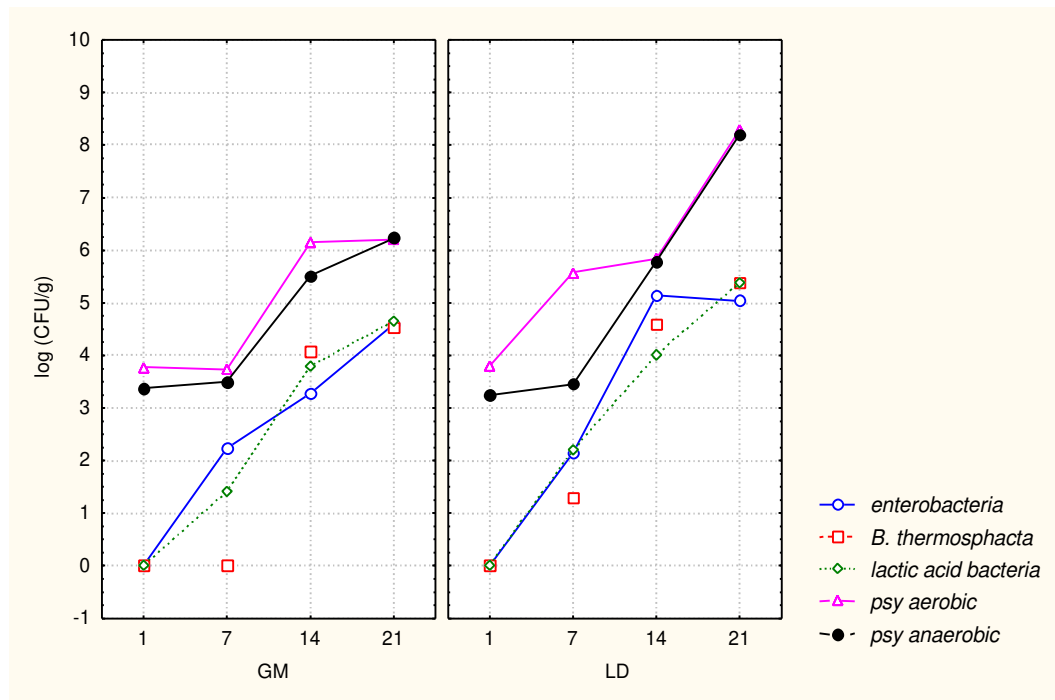


Figure 1. $\log_{10}$ of CFU/g of enterobacteria, *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria, psychrotrophic (psy) aerobic and anaerobic bacteria in GM and LD steaks packaged under T_1 : 69.8% N_2 / 30% CO_2 / 0.2% CO at $2 \pm 1^\circ C$.

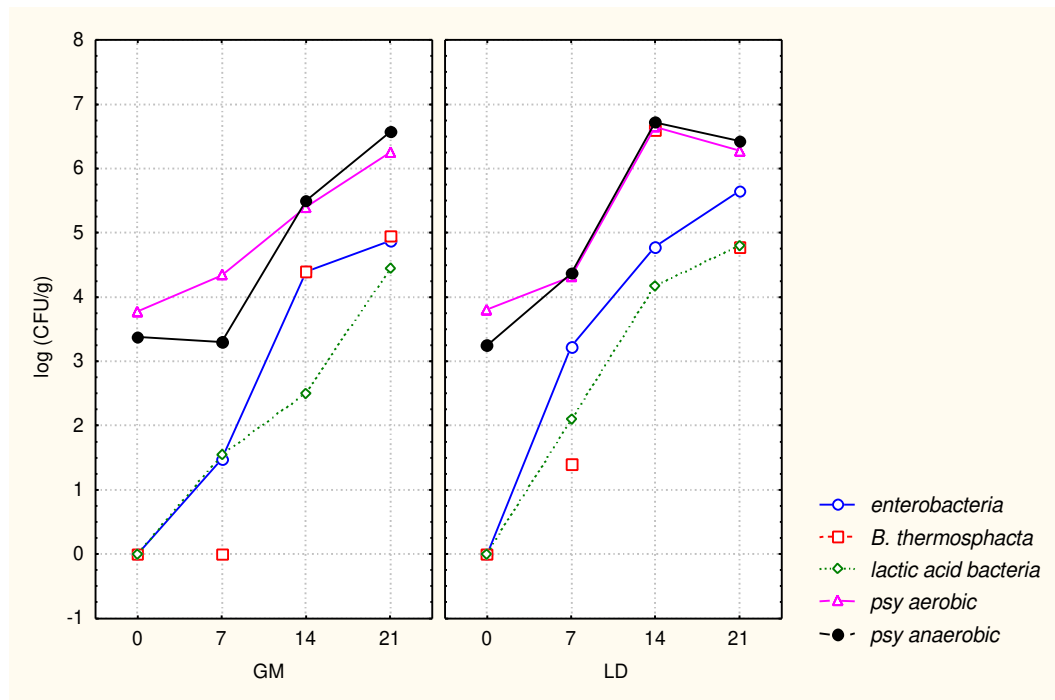


Figure 2. Log₁₀ of CFU/g of enterobacteria, *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria, psychrotrophic (psy) aerobic and anaerobic bacteria in GM and LD steaks packaged under T₂: 69.6% N₂ / 30% CO₂ / 0.4% CO at 2±1°C.

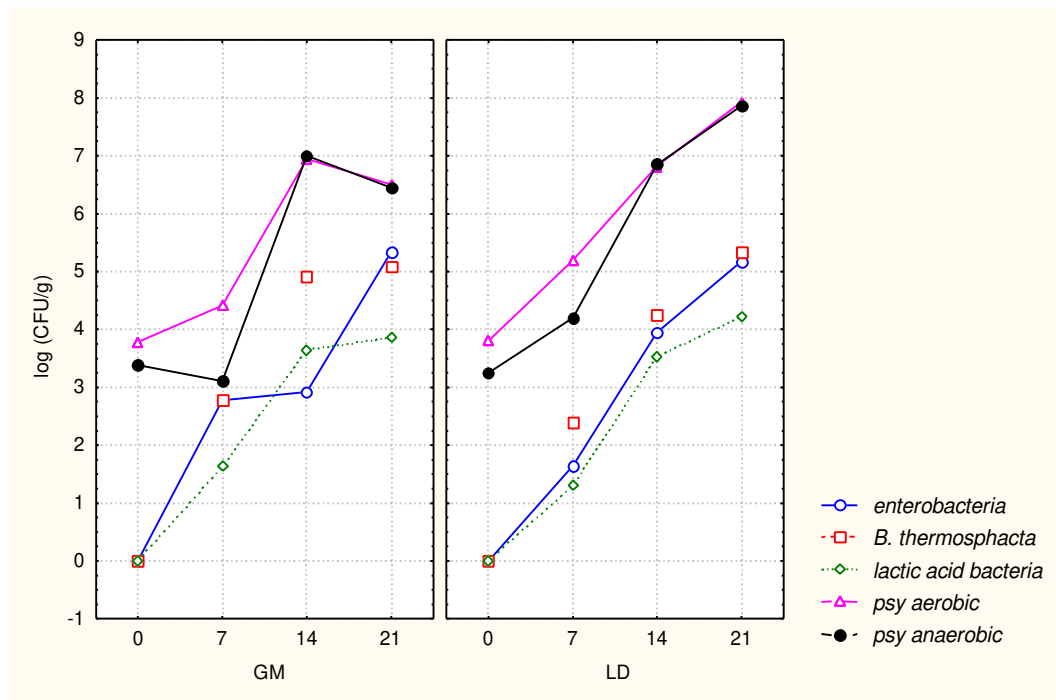


Figure 3. Log₁₀ of CFU/g of enterobacteria, *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria, psychrotrophic (psy) aerobic and anaerobic bacteria in GM and LD steaks packaged under T₃: 48.8 %N₂ / 30% CO₂ / 0.2% CO / 21% O₂ at 2±1°C.

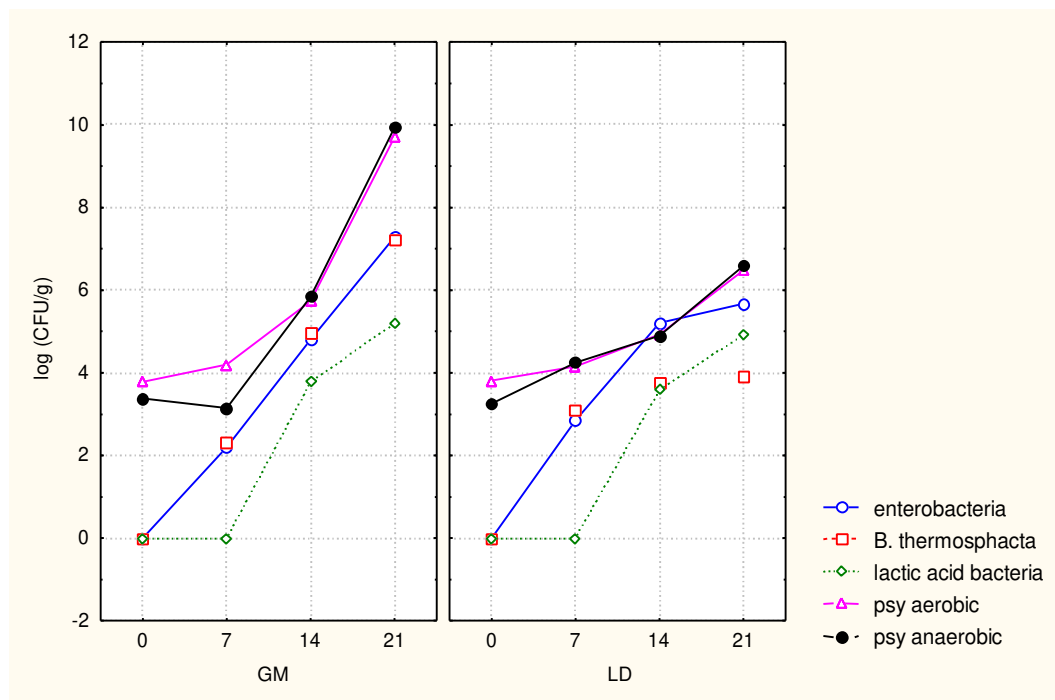


Figure 4. Log₁₀ of CFU/g of enterobacteria, *B. thermosphacta*, lactic acid bacteria, psychrotrophic (psy) aerobic and anaerobic bacteria in GM and LD steaks packaged under T₄: 48.6 %N₂ / 30% CO₂ / 0.4% CO / 21% O₂ at 2±1°C.

Initially, the GM and LD cuts presented low numbers of aerobic and anaerobic psychrotrophic microorganisms, whereas the other deteriorating and pathogenic microorganisms investigated were not found, allowing predicting a relatively long shelf life in MAP.

The different levels of CO (0.2 or 0.4%) and O₂ (0 or 21%) in the atmosphere did not affect significantly the microbiota development in the samples. However, the counts increased significantly as the period of storage in MAP increased ($p < 0.05$), except for *Salmonella*,

Listeria monocytogenes and sulphite-reducing *Clostridia*, which remained absent along the whole experiment.

The aerobic and anaerobic psychrotrophic counts reached approximately 7 log CFU/g after 14 days of storage in MAP at 2°C, the threshold for spoilage. The samples presented considerable counts of facultative anaerobics, such as enterobacterium and/or *B. thermosphacta*, which granted an unpleasant odor to some samples on the 21st day of storage. The similarity in the growth curves of aerobic and anaerobic psychrotrophic microorganisms, regardless the oxygen concentration in the atmosphere, reinforces the hypothesis that facultative anaerobics were probably the predominant microorganisms during the storage in MAP at 2°C. Such findings were also reported by Viana, Gomide & Vanetti (2005) in pork loins stored using different anoxic atmospheres with or without CO at 4°C.

The growth of facultative anaerobics can be attributed to the residual concentration of oxygen in the tray during the first days of anoxic storage (T₁ and T₂), whereas in aerobic packaging (T₃ and T₄) the development of these microorganisms was favored by the presence of 21% oxygen in the gas mixture.

The increase of 0.2 to 0.4% CO had no effect on the microbiological growth on beef steaks. The presence of bacteriostatic CO₂ in our experiments apparently reduced the importance of the effect of CO on the odor shelf life of the meat.

However, the growth of psychrotropic bacteria on beef stored in MAP containing 0.5-10% CO in N₂ was reduced and the odor shelf life increased (Clark, Lentz & Roth, 1976). Thus, the inhibitory ability can be the result of the sum of effects of these two gases.

3.4. Sensory analysis

The discoloration (%) and off-odor of the GM and LD steaks were affected ($p < 0.05$) by the oxygen concentration (0 or 21%), the storage time (0, 7, 14 and 21 days) and the interaction between the oxygen concentration versus the storage time (Table 3). Panel scores indicated increased browning, discoloration and off-odor with increase in storage time at higher oxygen concentration, probably due to preferential formation of oxymyoglobin at these oxygen level (Seyfert et al, 2006) associate to psychrotrophic counts, higher than 7.5 log CFU/g, considered the point at which off-odors appear (Luño, Beltrán & Roncalés, 1998).

Table 3

Means and standard error for %O₂ x display time interaction on instrumental color (n=10) and sensory panel scores (n=18) of GM and LD steaks.

Muscle	Trait	CO without O ₂				CO with O ₂				SE
		0	7	14	21	0	7	14	21	
GM	Chroma	23.4 ^{bd}	29.5 ^{ac}	33.2 ^a	33.8 ^a	22.9 ^{bd}	26.0 ^{bc}	26.1 ^{bc}	20.8 ^d	4.7
	Hue	36.1 ^a	32.1 ^b	32.3 ^b	29.9 ^b	36.7 ^a	36.9 ^a	38.9 ^a	41.6 ^a	10.1
	Visual score	6.5 ^b	7.3 ^{ab}	8.1 ^a	8.5 ^a	8.2 ^a	4.1 ^c	4.1 ^c	2.5 ^d	3.4
	% discoloration	4.5 ^{ab}	4.7 ^a	4.9 ^a	4.9 ^a	4.5 ^{ab}	4.8 ^a	4.1 ^b	2.6 ^c	0.5
	Off-odor	4.8 ^a	5.0 ^a	4.8 ^a	4.8 ^a	4.8 ^a	4.8 ^a	4.6 ^a	2.2 ^b	0.3
LD	Chroma	22.4 ^c	29.6 ^{ab}	32.0 ^a	32.5 ^a	21.2 ^c	25.0 ^{bc}	24.6 ^{bc}	23.0 ^c	5.8
	Hue	35.3 ^a	32.7 ^a	32.4 ^a	29.9 ^a	41.1 ^b	38.6 ^b	39.6 ^b	39.8 ^b	1.1
	Visual score	6.9 ^a	8.0 ^{ab}	8.8 ^b	8.7 ^b	4.8 ^c	3.2 ^d	3.2 ^d	3.3 ^d	3.0
	% discoloration	4.8 ^a	4.8 ^a	4.9 ^a	4.7 ^a	4.5 ^a	4.6 ^a	4.7 ^a	2.6 ^b	0.3
	Off-odor	4.9 ^{ab}	5.0 ^a	5.0 ^a	4.9 ^{ab}	4.8 ^{ab}	4.9 ^{ab}	4.6 ^b	2.8 ^c	0.2
	Fat appearance	5.0 ^a	5.0 ^a	4.5 ^b	4.4 ^b	5.0 ^a	5.0 ^a	2.9 ^c	1.9 ^d	0.2

SE = standard error

Means in a row with a different letter differ ($p < 0.05$)

Chroma = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$;

Hue = $\arctan(b^*/a^*)$

Visual score: 0 = brown; 5.0 = dark red; 9.0 = bright red.

% discoloration: 1 = 61-100%, 2 = 21-60% discoloration, 3 = 11-20% discoloration, 4 = 1-10% discoloration and 5 = 0% discoloration.

Off-odor: 1 = extreme off-odor; 2 = moderate off-odor; 3 = small off-odor; 4 = slight off-odor and 5 = no off-odor.

Fat appearance: 1 = very strongly disagree; 2 = disagree; 3 = no opinion; 4 = agree; 5 = very strongly agree.

The GM steaks packaged in CO without oxygen presented a bloomed color that was similar or higher than the initial color of the fresh beef (0 d) and practically did not present a visible discoloration or perceptive off-odor along the 21 days of storage time. The visual color of the GM or LD steaks in oxygen-free atmosphere was statistically affected by the increase of the CO concentration. The LD steaks stored in 0.4% CO and without oxygen

presented a stable pinkish tonality, after 21 days of storage, which was regarded as 'artificial' by some panelists.

These data suggest that an increase in the CO concentration can change significantly the natural color of fresh beef with inherent color stability, such as LD. Luño *et al.* (2000) showed that the amount of CO fixed by meat myoglobin decreased linearly with reducing CO concentration in the gas mixtures, as was previously noted by Sørheim *et al.* (1997). Thus, there might be an optimal concentration of CO for each muscle, that is, there might be a concentration from which the maximum stability of the typical color of fresh beef is achieved.

In the samples packed in CO with 21%O₂ (T₃ and T₄) the change from red to dark-red generally coincided with the beginning of the formation of visible brown spots.

In the GM steak samples of treatments T₃ and T₄, the formation of brown spots depended on the CO concentration. In the steaks packed in 0.2%CO, an area around 11-20% became visible from the 14th day of storage and reached ~60% of the steaks after 21 days. As to the samples stored in 0.4%CO, discoloration became apparent (~20%) only after 21 days of storage in MAP. The formation of perceptible brown spots in the LD steaks stored in 21% O₂ only occurred after 21 days of storage, regardless the CO concentration as shown in Figure 5.

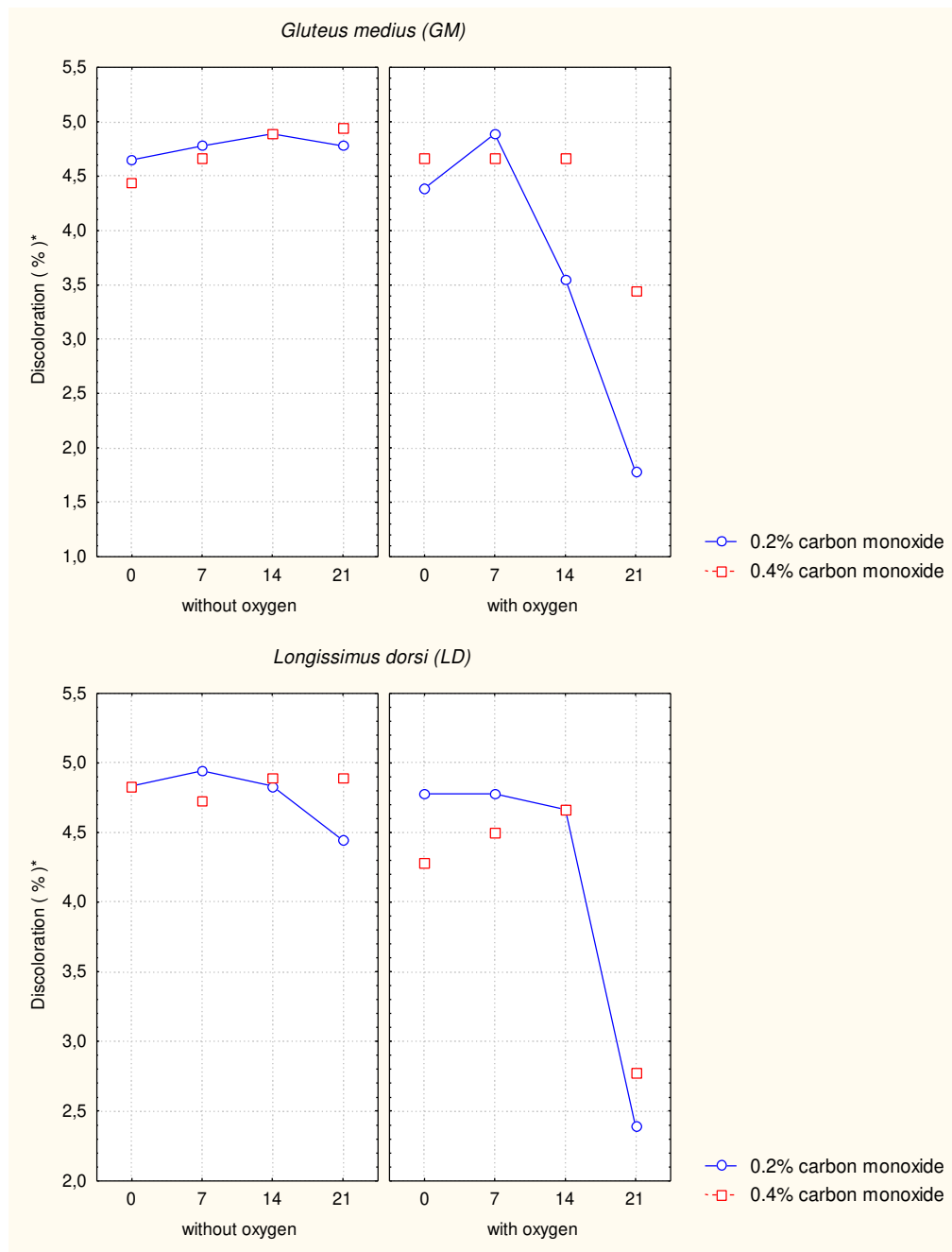


Figure 5. Interaction effects of %O₂, %CO and display time on discoloration of fresh steaks stored at 2±1°C.

Previous results reported that increasing concentrations of CO above 0.5% extended the odor shelf life of meat over than that achieved with 50% CO₂ (Luño *et al.*, 2000).

In this experiment, the perception of a moderately off-odor (?2.0) occurred only for the samples stored in oxygen (T₃ and T₄), after the 21st day of storage at 2°C, when the score of aerobic psychrotrophic microorganisms was higher than 7.5 log CFU/g. After 21 days of storage at 2°C, the samples packaged under anoxic conditions still presented an excellent fresh meat odor irrespective of the CO concentration. Previous results reported that increasing concentrations of CO above 0.5% extended the odor shelf life of meat over than that achieved with 50% CO₂ (Luño *et al.*, 2000). According to Gill & Jones (1994), the development of slightly acid odors produced by lactic bacteria under anaerobic conditions is only observed when the count is near or higher than 5 logCFU/g, whereas the putrid odor is only observed when the number of aerobic bacteria is equal or higher than 6 logCFU/g.

3.5 Instrumental evaluation of color

The oxygen concentration (0% or 21%) significantly affected the color of samples, except hue angle (h*) for LD steaks. The interaction of oxygen concentration (0% or 21%) versus time storage did not affect L* values for LD steaks but significantly affected all other color measurements. Initially (0 d) all the samples had similar C* values, but after 7 days of storage the GM steaks packaged in virtually oxygen-free atmosphere had higher chroma (>C*) and lower hue angle (<h*) than initial color of product, whereas LD steaks in anoxic atmospheres had similar C* and h* at all storage times, except at 21 days when the C* values were inferior than fresh steaks (0 d). The means for the main and two-way

interactions effects of oxygen and storage time on chroma values ($C^* = [(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$) and hue angle ($h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$) are shown in Table 3. LD steaks stored in 0.4% CO had higher L^* than those stored in 0.2%. The lighter color for LD steaks in 0.4% may be due to a deeper layer of COMb, which reached about 0.5 cm from the steaks surface reaching 1.5cm of thickness, after 21 days in MAP. These findings agree with the results reported by Jayasing *et al.* (2001) and Hunt *et al.* (2004) which shown that CO penetration increase with CO concentration and storage time.

The higher C^* on the surface of LD steak stored in 0.4% CO without O_2 than those packaged containing 21% oxygen could be attributed to the inability of CO to displace oxygen bound to myoglobin for promoting color stability (Seyfert *et al.*, 2007). Although previous research has demonstrated the ability of oxygen to stabilize meat color (Luño *et al.*, 1998; Luño *et al.* 2000), this study showed that addition of 21% oxygen to primary packages with CO had a negative impact on color stability. According to Seyfert *et al.* (2007), the 0.4% CO with 20% or 80% oxygen may not have impacted color, due to preferential formation of oxymyoglobin rather than carboxymyoglobin at 20% or 80% oxygen.

The ratios of 630:580 nm approach 1.0 for metmyoglobin and >4.0 for oxymyoglobin (AMSA, 1991). Therefore, the oxidation of oxymyoglobin to metmyoglobin during storage time can be followed by monitoring the shape of the reflectance curves as shown in Figure 6.

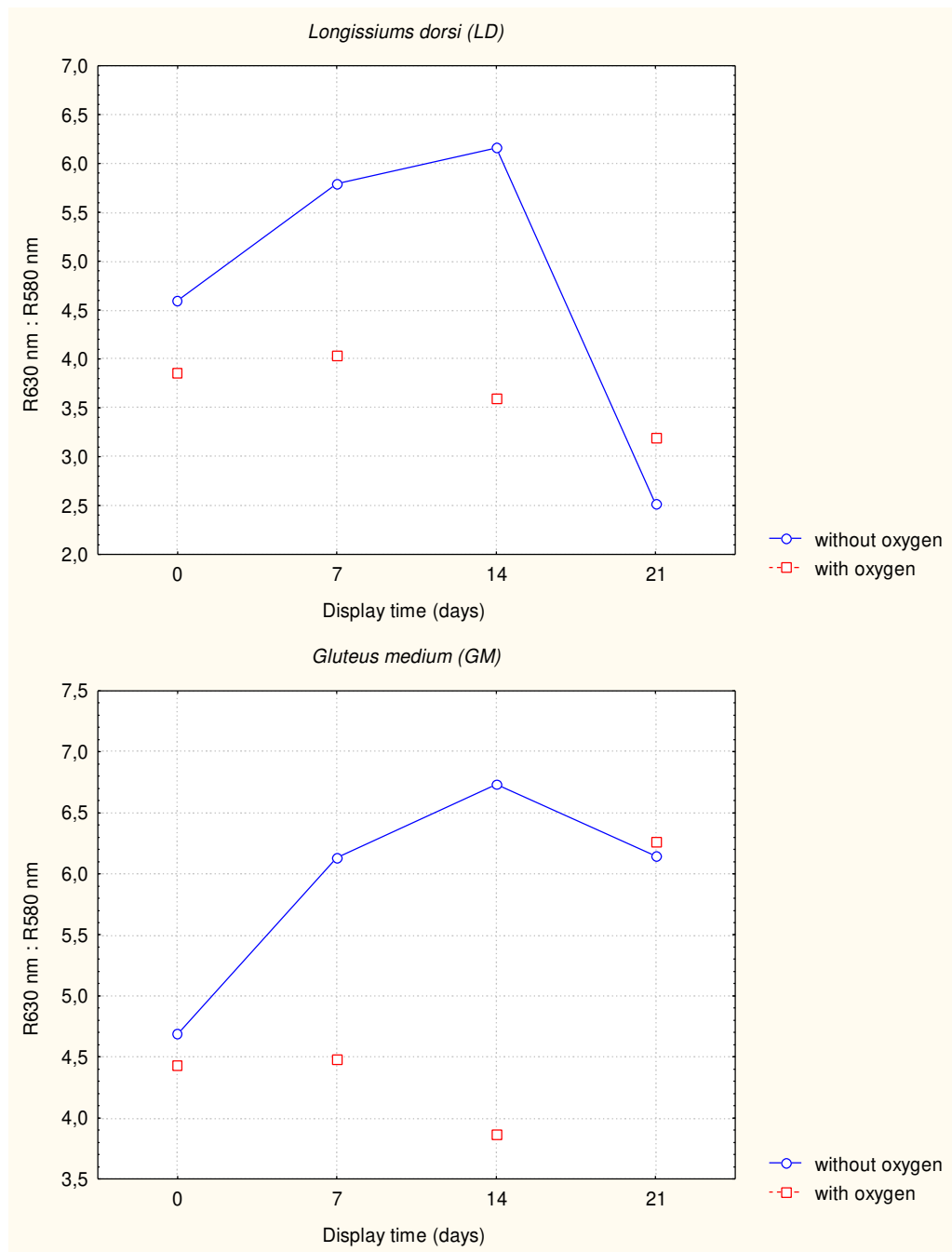


Figure 6. Interaction effects of %O₂ and display time on ratios of reflectance (R630 nm : R580 nm) of fresh steaks stored at 2 ± 1°C.

The GM samples stored without oxygen had R630 : R580 values similar to or greater than ($p < 0.05$) those obtained on the day the steaks were processed (0 d), irrespective of carbon monoxide concentration. The development of brownish-red color in the LD steaks stored with oxygen for 21 days was followed by a decrease in the ratio of oxymyoglobin to metmyoglobin, which caused a significantly ($p < 0.05$) decrease in the ratios R630nm : R580 nm. The GM steaks stored with oxygen were not affected detrimentally. At 21 days of storage with oxygen, the GM steaks were redder ($p < 0.05$) than steaks stored at 7 or 14 days, that were similar to the product initial color. It is important to point out that the very small brown color spots were avoided during the instrumental readings of reflectance in this experiment. In these cases, the spots of the samples were determined only visually during the sensory analysis. Therefore, the CIEL*a*b* values and the reflectance spectra do not represent such discoloration, which would certainly make the values of L* and C* decrease even more and raise the h* values of the samples stored with oxygen, due to the increase in the metmyoglobin rate.

4. Conclusion

The preservation of color and odor of GM and LD steaks packaged under low carbon monoxide was best achieved using atmospheres virtually without oxygen. Anoxic atmospheres with 0.2%CO produced a satisfactory color stabilization, showing a clear advantage from the toxicological. The packaging of the fresh beef in atmosphere containing 69.8% N₂ / 30% CO₂ / 0.2% CO showed to be the most suitable technique for the maintenance of the color stability for 21 d at 2°C, although results were improved by using 0.4%CO. Color stabilisation using low CO with or without oxygen did not result in

an increased microbial risk following storage up to 21 days at 2°C. However, the shelf-life was limited by a modification of odor that occurred at 21 days of storage. Nevertheless, the results showed that 30% of CO₂ is not enough to inhibit the growth of deteriorating microbiota in periods of up to 21 days. The optimization of factors, which increased the absorption of CO₂ by the beef, such as permeability, temperature, partial CO₂ pressure and relation of the head space volume to the amount of beef became crucial to obtain a maximum antimicrobial effect. However, the principles of Good Manufacturing Practice (GMP) and Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) must be used to reduce the initial contamination of the meat.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support provided by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – São Paulo, SP, Brazil), Research Project n°. 04/14644-8. Thanks all the panelists of the ESALQ-USP (Piracicaba, SP, Brazil) for their skill and tolerance in all the sensory analysis sessions. Special thanks to Ligianne Din Shirahigue and Cecília Helena Nogueira for their skillful technical assistance. The authors also thank and acknowledge the AGA S.A. – Linde Group (Jundiaí, SP, Brasil) and Marfrig Slaughterhouse Food Commerce Ltd. (Promissão, SP, Brasil) for generously providing us with the special gas mixtures and samples of meat, respectively.

References

[ANVISA] Brazilian National Health Surveillance Agency. 2001. Resolução RDC nº 12. Brasília: Ministério da Saúde. Available from: www.anvisa.gov.br Accessed Aug 10.

AMSA. (1991). Guidelines for meat color evaluation. Proceedings Reciprocal Meat Conference. American Meat Science Association in cooperation with the National Live Stock and Meat Board, now the National Cattlemen's Beef Association, Centennial, CO.

Clark, D.S., Lentz, C.P. & Roth, W.D. (1976). Use of carbon monoxide for extending shelf-life of prepackaged fresh beef. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 9(3), 114-117.

Downes, F. P. & ITO, K. (ed.). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.

Gill, C. O. & McGinnis, J. C. (1995). The effects of residual oxygen concentration and temperature on the degradation of the colour of beef packaged under oxygen-depleted atmospheres. Meat Science, 39(1), 387-394.

Gill, C.O. & Jones, T. (1994) The display of retail-packaged beef steaks after their storage in master packages under various atmospheres. Meat Science, 38(3), 385-396.

Gill, C.O. & Penney, N. (1988). The effect of the initial gas volume to meat weight ratio on the storage life of chilled beef packaged under carbon dioxide. Meat Science, 22, 53–63.

Gill, C.O. (1996). Extending the storage life of raw chilled meats. Meat Science, 43(S), S99-S109.

Hunt, M.C., Mancini, R.A., Hachmeister, K.A., Kropf, D.H., Merriman, M., DelDuca, G. & Milliken, G. (2004). Carbon monoxide in modified atmosphere packaging affects color,

shelf life, and microorganisms of beef steaks and ground beef. *Journal of Food Science*, 69(1), 45-52.

Isdell, E. Allen, P.Doherty A.M. & Butler, F. (1999). Colour stability of six beef muscles stored in a modified atmosphere mother pack system with oxygen scavengers. *International Journal of Food Science and Technology*, 34(1), 71-80.

Jakobsen M. (2003), Optimizing MAP of meat through modelling. Modelling colour stability and changes in headspace gas composition during storage. Ph.D. Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. ISBN 87-7611-033-8.

Jakobsen,M. & Bertelsen, G. (2004) Predicting the amount of carbon dioxide absorbed in meat. *Meat Science*, 68(4), 603-610.

Jayasingh, P., Cornforth, D.P., Carpenter, C.E. & Whittier D. (2001) Evaluation of carbon monoxide treatment in modified atmosphere packaging or vacuum packaging to increase color stability of fresh beef. *Meat Science*, 59(3), 317-324.

Jeremiah, L.E., Gibson, L.L. & Arganosa, G.C. (1996). The influence of CO₂ level on the storage life of chilled pork stored at - 1.5 °C. *Journal of Muscle Foods*, 7(1), 139–148.

John, L., Cornforth, D., Carpenter C.E., Sørheim, O., Pettee B.C. & Whittier, D.R. 2005. Color and thiobarbituric acid values of cooked top sirloin steaks packaged in modified atmospheres of 80% oxygen, or 0.4% carbon monoxide, or vacuum. *Meat Science*, 69(3), 441-49.

Luño, M., Béltran, J.A. & Roncalés, P. (1998). Shelf-life extension and colour stabilisation of beef packaged in a low O₂ atmosphere containing CO: loin steaks and ground meat. *Meat Science*, 48 (1-2): 75-84.

Luño, M., Roncales P., Djenane D., Beltran J.A. (2000). Beef shelf life in low O₂ and high CO₂ atmospheres containing different low CO concentrations, *Meat Science* 55 (4): 413–19.

Meilgaard M.; Civille G. V. & Carr, B. T. (1987). Sensory evaluation techniques. Boca Raton: CRC Press.

Nissen, H. Alvseike, O. Bredholt, S. Holck, A. and Nesbakken T. (2000) Comparison between growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques, *International Journal of Food Microbiology* 59, 211–20.

Penney, N. & Bell, R.G. (1993). Effect of residual oxygen on the colour, odour and taste of carbon dioxide-packaged beef, lamb and pork during short term storage at chill temperatures. *Meat Science*, 33(2), 245–252.

Rousset, S. & Renerre, M. (1991). Effect of CO₂ or vacuum packaging on normal and high pH meat shelf-life. *International Journal of Food Science and Technology*, 26 (6), 641-652.

Seyfert, M., Mancini, R.A., Hunt, M.C., Tang, J. & Faustman, C. (2007). Influence of carbon monoxide in package atmospheres containing oxygen on colour, reducing activity, and oxygen consumption of five bovine muscles. *Meat Science*, 75(3), 432–42.

Sørheim, O., Aune, T. & Nesbakken, T. (1997). Technological, hygienic and toxicological aspects of carbon monoxide used in modified-atmosphere packaging of meat. *Trends in Food Science & Technology*, 8(9), 307-12.

Sørheim, O., Nissen, H. & Nesbakken, T. (1999). The storage life of beef and pork packaged in atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide. *Meat Science*, 52(2), 157-164.

Shay, B.J. & Egan, A.F. (1987). The packaging of chilled red meats. *Food Technology in Australia*, 39(6), 283–285.

Sørheim, O., Ofstad, R. & Lea, P. (2004) Effects of carbon dioxide on yield, texture and microstructure of cooked ground beef. *Meat Science*, 67(2), 231-236.

Tewari, G., Jayas, D. S., Jeremiah, L. E. & Holley, R. A. (2001). Prevention of transient discoloration of beef. *Journal of Food Science*, 66(3), 506-510.

Venturini, A.C.; Contreras, C.J.C.; Sarantópoulos, C.I.G.L. & Villanueva N.D.M (2007) The Effects of Residual Oxygen on the Storage Life of Retail-1 Ready Fresh Beef Steaks Masterpackaged under atmosphere of CO₂. *Journal of Food Science*, .

Viana, E.S., Gomide, L.A.M., Vanetti, M.C.D. (2005). Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. *Meat Science*, 71(4), 696-705.

Wilkinson B.H.P., Janz J.A.M., Morel P.C.H., Purchas R.W., Hendriks, W.H. (2006). The effect of modified atmosphere packaging with carbon monoxide on the storage quality of master-packaged fresh pork. *Meat Science*, 73(4), 605-610.

ANEXOS



Figura 1 – Contrafilé após 21 dias de estocagem em 0,2% CO/30%CO₂/69,8%N₂ a 2°C.



Figura 2 – Alcatra após 21 dias de estocagem em 0,2%CO/30%CO₂/69,8%N₂ a 2°C.



Figura 3 – Contrafilé após 21 dias de estocagem em 0,4%CO/30%CO₂/69,6%N₂ a 2°C.



Figura 4 – Alcatra após 21 dias de estocagem em 0,4%CO/30%CO₂/69,6%N₂ a 2°C.



Figura 5 – Contrafilé após 21 dias em 48,8 %N₂/30%CO₂ /0,2%CO/21%O₂ a 2°C.



Figura 6 – Alcatra após 21 dias em 48,8 %N₂/30%CO₂ /0,2%CO/21%O₂ a 2°C.



Figura 7 – Contrafilé após 21 dias em 48,6 %N₂ / 30%CO₂ / 0,4%CO / 21%O₂ a 2°C.



Figura 8 – Alcatra após 21 dias em 48,6 %N₂ / 30%CO₂ / 0,4%CO / 21%O₂ a 2°C.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO DE MONÓXIDO DE CARBONO EM DIFERENTES SISTEMAS DE EMBALAGENS PARA CARNE BOVINA FRESCA

RESUMO

Bifes de miolo de alcatra (*gluteus medius*) e contrafilé (*longissimus dorsi*) foram acondicionados em embalagem primária contendo 0,2%CO/30%CO₂/69,8%N₂, com e sem absorvedores de oxigênio, e em embalagem de distribuição (*masterpack*) em 100% de dióxido de carbono e com absorvedores de oxigênio. Cor instrumental e sensorial, aroma e qualidade microbiológica, entre outros parâmetros de qualidade, foram avaliados após 0, 7, 14 e 21 dias de estocagem a 2°C. A aplicação de 0,2 % CO minimizou os efeitos da concentração residual de oxigênio sobre a cor dos bifes de alcatra e contrafilé, que mantiveram cor e aroma similares ou superiores ao da carne fresca durante os 21 dias de estocagem em AM, independente do uso de absorvedores de oxigênio. A conservação da carne estocada em embalagem de distribuição com 100% CO₂ foi limitada pela intensa descoloração observada desde os períodos iniciais de estocagem, devido ao acúmulo de metamioglobina que ocorreu sob concentrações residuais de oxigênio, mesmo com o uso de absorvedores de oxigênio. *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* sulfito redutor não foram detectados em nenhuma das amostras e a contagem de bactérias psicrotróficas foram inferiores a 7,5 log UFC/g. Esses resultados mostram que a carboximoglobina formada a partir da adição de 0,2%CO associado a 30% CO₂ não mascarou a deterioração microbiológica da carne acondicionada a 2°C por 21 dias.

Palavras-chave: monóxido de carbono, atmosfera modificada, carne bovina, cor, microbiologia.

SUMMARY

Sirloin (*gluteus medius*) and striploin (*longissimus dorsi*) steaks were packaged adding 0,2%CO/30%CO₂/69,8%N₂ to primary packages (with or without oxygen scavenger) or 100%CO₂ in masterpacks (with oxygen scavenger). Steaks were evaluated on 0, 7, 14 and 21 days of MAP at 2°C for instrumental and visual colour, odour and microbiology counts, among others quality parameters. The 0.2 %CO mixture minimized the effects of residual oxygen on colour stability of sirloin and striploin steaks, compared with products stored with 100% CO₂. The color stability of steaks stored for up to 21 days in MAP containing CO was similar to or superior to fresh steaks, independent of oxygen scavenger use. The instrumental analysis confirmed these results. The preservation of steaks stored in masterpack under 100%CO₂ was limited by rapid discoloration due the rate of metmyoglobin accumulation in meat exposed to residual oxygen, despite the use of oxygen scavenger. *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and sulphite-reducing *Clostridium* were not detected in any samples tested and no steaks had pathogenic bacteria or levels of psychrotrophic counts >7,5 log UFC/g. These results showed that carboxymyoglobin formed from 0,2% CO with 30% CO₂ did not mask microbial spoilage of beef steaks stored during 21 days at 2°C.

Keywords: carbon monoxide, modified atmosphere, beef, colour, odour, microbiology

1 - INTRODUÇÃO

A formação de metamioglobina em baixíssimas concentrações de oxigênio é um problema que afeta a aparência da carne embalada sob essas condições, porque a oxidação da deoximioglobina a metamioglobina é mais rápida que a oxidação da oximioglobina (Gill, 1996). Uma vez produzida, a metamioglobina pode ser reconvertida a deoximioglobina através da atividade de enzimas ou cofatores presentes no tecido muscular (O'Keeffe & Hood, 1982). No entanto, alguns músculos apresentam dificuldade para a redução da metamioglobina a deoximioglobina, bem como para converter a deoximioglobina púrpura a oximioglobina vermelha, após longos períodos de estocagem sob concentrações residuais de oxigênio. Uma descoloração transitória pode ocorrer se a concentração de oxigênio for $\geq 0,04\%$ para *Longissimus dorsi* ou $\geq 0,01\%$ para *Psoas major* ou carne moída quando estocados a $-1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gill & Jones, 1994a, 1994b; Gill & McGinnis, 1995), podendo tornar-se irreversível se a concentração de oxigênio for suficientemente alta para exaurir a atividade enzimática e de cofatores responsáveis pela redução da metamioglobina no músculo (O'Keeffe & Hood, 1980-81a; 1980-81b; 1982). Por este motivo, sistemas de embalagem livres de oxigênio têm tido aplicação limitada pelos frigoríficos que centralizam a operação de pré-embalagem da carne em bandeja.

O *masterpack* ou embalagem de distribuição consiste de um saco confeccionado com filme co-extrusado de alta barreira aos gases, onde um certo número de bandejas é agrupado, e no interior do qual é feita a modificação da atmosfera. Nesse sistema de embalagem, a carne é geralmente acondicionada em atmosfera livre de oxigênio, geralmente $100\%\text{N}_2$ ou CO_2 , até a exposição ao varejo, quando então as bandejas são retiradas dos sacos e expostas ao ar atmosférico, readquirindo a coloração vermelha típica de carne fresca, através da reoxigenação da deoximioglobina, fenômeno este conhecido na literatura científica como *reblooming*. Em embalagens de distribuição termoseladas em atmosfera virtualmente anóxica pode haver oxigênio residual originalmente ocluído na própria bandeja, por permeação através da própria embalagem barreira, por falhas na região de termoselagem ou ainda em consequência de evacuação incompleta do ar existente na embalagem e/ou injeção

insuficiente da nova mistura gasosa após a evacuação, durante a operação do equipamento. Alguns destes fatores são inevitáveis em situações comerciais e por este motivo o uso de absorvedores de oxigênio parece ser imperativo para a embalagem da carne em atmosfera teoricamente livre de oxigênio, como comumente utiliza-se nos sistemas de embalagem de distribuição (Tewari et al, 2002). Outra alternativa é a aplicação de uma mistura gasosa dentro da embalagem capaz de minimizar a influência da variabilidade intermuscular na estabilidade da cor da carne (Hunt et al 2004). Lanier et al (1978) concluíram que redução da metamioglobina em *Semitendinosus* oxidado com ferrocianeto foi aumentada na presença de monóxido de carbono. Portanto, a aprovação da *Food and Drug Administration* para o uso do CO em embalagem de distribuição (FDA, 2002) e em embalagem primária (FDA, 2004) pode representar uma oportunidade única para minimizar os problemas de reoxigenação, particularmente em produtos mais sensíveis à oxidação como o filé mignon e a carne moída, por exemplo.

A adição de baixas concentrações de CO pode eliminar os problemas de reoxigenação da carne estocada em atmosfera livre de oxigênio (Hunt et al 2004). Mas o CO é um gás tóxico e, portanto, seu uso não é permitido na maioria dos países. Em 1997, Sørheim, Aune & Nesbakken. publicaram uma detalhada revisão sobre os aspectos tecnológicos, higiênicos e toxicológicos do uso de CO em atmosfera modificada para carne, e concluíram que o CO em concentração de 0,5%, além de conferir uma série de vantagens como o aumento da vida útil, estabilidade da cor e redução de custos, não representa nenhuma ameaça toxicológica aos consumidores. O monóxido de carbono estabiliza a cor vermelha da carne estocada por períodos prolongados, através da interação do CO com o íon ferroso da mioglobina (Hunt et al, 2004). Essa reação é limitada a uma fina camada superficial que corresponde à profundidade da penetração do CO (Jayasingh et al, 2001). A carboximioglobina possui espectro de cor muito semelhante ao da oximioglobina formada durante a exposição da carne fresca ao oxigênio do ar atmosférico (Viana, Gomide & Vanetti, 2005). A diferença entre a carboximioglobina e a oximioglobina, é que a primeira é muito mais estável à oxidação sob condições anaeróbicas (Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999; Luño, Béltran & Roncalés, 1998).

O objetivo deste experimento foi comparar o efeito da concentração residual de oxigênio sobre a carne fresca acondicionada sob 0,2% de monóxido de carbono.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Porcionamento dos bifes e embalagem em atmosfera modificada (AM)

Para o porcionamento da carne na forma de bifes (15mm de espessura) foram utilizadas quinze peças de miolo de alcatra sem gordura (*Gluteus medius*) e quinze peças de contrafilé (*Longissimus dorsi*) contendo gordura externa (1-3mm). Os músculos foram oriundos de carcaças de novilhos cruzados com zebuínos, castrados e com cerca de 20 meses de idade. A desossa ocorreu 24 h *postmortem* no Frigorífico Marfrig, localizado na cidade de Promissão - São Paulo. O processamento dos bifes e a embalagem em atmosfera modificada aconteceram 48h após a desossa.

Ao todo foram processadas 40 bandejas de cada corte para cada tratamento, contendo cerca de 250g de bifes. As bandejas foram aleatoriamente acondicionadas em três diferentes atmosferas denominadas T₁, T₂ e T₃:

T₁: 0,2% CO + 30% CO₂ + 69,8% N₂

T₂: 0,2% CO + 30% CO₂ + 69,8% N₂ + absorvedor de O₂

T₃: 100% CO₂ + absorvedor de O₂

A composição gasosa dos cilindros foi produzida e certificada pela empresa AGA (Linde Group).



Figura 1 – Ajuste na válvula de pressão do cilindro contendo a mistura gasosa.

Nos tratamentos T_1 e T_2 a mistura gasosa foi modificada diretamente na embalagem primária, composta de bandejas termoformadas laminadas do tipo poliéster/PEAD (Emplal Embalagens Plásticas Ltda.), seladas com filme co-extrusado de alta barreira (PA/EVOH/PELBD, Cryovac[?], Sealed Air) com espessura nominal total de 457 μ m, permeabilidade ao oxigênio de 5,0cm³/m²/24h a 23°C e 0% de umidade relativa (UR) e taxa de permeabilidade ao vapor de água de 14g/m²/24h a 38°C e 90%UR. As bandejas codificadas foram colocadas nos moldes de uma máquina termoseladora equipada com câmara de vácuo (Smart 500, ULMA Packaging Ltda.) que opera com controle automático programável do ciclo de vácuo/injeção/fechamento do filme tampa. Em cada bandeja do tratamento T_2 foi colocado um sachê absorvedor de oxigênio com capacidade nominal de absorção de 200cm³ de O₂ (FT200, O-Buster[?]; Hsiao Sung Non-Oxygen Chemical Co., Ltd., Taiwan).

No tratamento T_3 o CO₂ puro foi injetado no interior de sacos co-extrusados de alta barreira aos gases (PEAD/poliamida/copolímero de etileno e álcool

vinílico/poliamida/PEBD) denominados comercialmente como *masterpack* (Unipac Embalagens Ltda.). A taxa de permeabilidade ao oxigênio do *masterpack* foi de 0,17 mL/m²/24h a 25°C e 1 atm. Quatro bandejas convencionais (poliestireno expandido) envoltas com filme de alta permeabilidade ao oxigênio, o policloreto de vinila (PVC) foram colocadas em cada saco (50cm x 40cm = 0,20m² de área). A modificação da atmosfera no *masterpack* foi feita em máquina equipada com câmara de vácuo (marca Selovac, modelo 300B, São Paulo, SP), operando com um ciclo de vácuo e injeção de atmosfera a 0,97 atm de pressão de CO₂ puro.

Antes da selagem dos sacos foi adicionado um sachê absorvedor de oxigênio com capacidade nominal de absorção de 500cm³ de O₂ (HV500, ATCO[?], Standa Industrie, France).

As bandejas de todos os tratamentos continham um absorvedor de líquido com capacidade de absorver um volume de 100mL de exsudado (Dri-loc[?], Cryovac[?], Sealed Air, São Paulo, SP-Brasil).

Todos os produtos foram estocados sob temperatura controlada (2°C) e avaliados periodicamente após 7, 14 e 21 dias de estocagem em AM.

2.2 - Avaliação de pH

O pH dos bifés de alcatra e contrafilé foi avaliado através de um eletrodo de vidro (Ingold, WTWpH91) colocado diretamente sobre a carne.

2.3 - Composição gasosa

Os níveis de gás carbônico e de oxigênio no espaço-livre das embalagens em atmosfera modificada foram avaliados no dia do processamento (0 d) imediatamente após a selagem e, periodicamente, após 7, 14 e 21 dias de estocagem. As análises foram realizadas utilizando um analisador de gases portátil (CheckPoint[®], PBI Dansensor A/S, Ringsted, Denmark). A mistura gasosa do espaço-livre foi coletada com uma seringa hermética,

através de um septo de silicone colado na superfície das embalagens. As análises foram realizadas em quatro embalagens por tratamento selecionadas aleatoriamente a cada período de estocagem e os valores médios foram expressos em porcentagem de CO₂ e O₂ (v/v).

2.4 - Avaliação sensorial

Antes do início dos testes sensoriais, foram realizadas cinco sessões de treinamento para familiarizar os provadores com os atributos e as escalas utilizadas, de acordo com a metodologia sugerida por Meilgaard, Civille & Carr (1987). Imagens fotográficas foram utilizadas como referências. Durante as sessões de treinamento foram recrutados doze provadores com motivação e disponibilidade para participar de todo o experimento.

Em princípio os atributos sensoriais foram avaliados utilizando as escalas sugeridas pela AMSA (1991), mas ao longo das sessões as escalas sofreram vários ajustes sugeridos pela equipe de provadores.

O atributo “cor da carne” foi avaliado através de uma escala não-estruturada de 9cm, ancorada nos extremos com os seguintes termos descritivos: 0cm = marrom e 9cm = vermelho típico de carne fresca. Para “% de mancha” da carne foi utilizada uma escala mista de cinco pontos onde: 5 = nenhuma (0%); 4 = leve (1-10%); 3 = pequena (11-20%); 2 = moderada (21-60%); 1 = intensa (61-100%). O “odor desagradável” da carne foi avaliado através de uma escala estruturada de cinco pontos onde 5 = nenhum odor/aroma normal; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável. A “aparência da gordura” dos bifes de contrafilé foi avaliada como 5 = muito agradável; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável. Durante as sessões de treinamento estabeleceu-se que o ponto mediano de cada escala seria considerado o limite para a venda do produto em relação ao atributo avaliado, ou seja, após atingir esta nota o produto não se encontrava atrativo, tendo perdido seu valor comercial.

2.5 - Cor instrumental

A cor instrumental foi medida sobre a superfície da carne imediatamente após a abertura da bandeja utilizando um espectrofotômetro portátil (MiniScan[®] XE Plus, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA) conectado a um computador equipado com o Software Universal, versão 4.10. O espectrofotômetro foi calibrado de acordo com as recomendações do fabricante e padronizado para operar com as seguintes especificações: diâmetro de abertura de 2 cm, ângulo de observação 10° e iluminante D65. As coordenadas CIE $L^*a^*b^*$, o índice de saturação da cor (C^*) = $[(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$ e ângulo-hue (h^*) = $\tan^{-1}(b^*/a^*)$ das amostras foram obtidos pela movimentação do aparelho, em quatro posições diferentes, de tal forma que toda a superfície disponível da carne fosse amostrada. As amostras foram avaliadas em duplicata (n=2). A porcentagem de metamioglobina na superfície da carne foi estimada pelo método simplificado de reflectância ($R_{630nm}:R_{580nm}$) através das curvas espectrais obtidas (AMSA, 1991; Strange et al, 1974). As medidas foram realizadas sobre a superfície da carne coberta com filme de PVC transparente, 30 minutos após a abertura das bandejas e exposição da carne ao ar.

2.6 - Análises microbiológicas

A caracterização microbiológica da matéria-prima foi realizada no dia do processamento dos bifes (0 d) e durante a estocagem em atmosfera modificada (14 e 21 dias) através da contagem de bactérias psicrótróficas aeróbias e anaeróbias, enterobactérias, bactérias lácticas, *Salmonella sp.*, *Clostridium Sulfito Redutor*, *Listeria monocytogenes* e *Brochothrix thermosphacta*. Foram analisadas duas amostras por corte de carne. Diluições decimais seriadas apropriadas foram preparadas e cada amostra foi plaqueada em duplicata (n=4) conforme as metodologias de Downes & Ito (2001). As contagens foram expressas como log UFC/g.

2.7 - Avaliação estatística

O experimento foi um delineamento fatorial com três tratamentos (T₁: 69.8 %N₂ / 30% CO₂ / 0.2% CO; T₂: 69.8% N₂ / 30% CO₂ / 0.2% CO + absorvedor de oxigênio e T₃: 100% CO₂), quatro períodos de estocagem a 2°C (0, 7, 14 e 21 dias), dois músculos (M. *Gluteus medius* and M. *Longissimus dorsi*) e duas repetições de todo o experimento. As médias foram calculadas por análise de variância (ANOVA) usando o programa Statistica? (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo cálculo do Teste de Tukey, quando apropriado. O nível de significância usado para todas as análises estatísticas foi 5% ($p < 0,05$).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Avaliação do pH

O pH inicial de todas as amostras foi menor que 5,8. O tratamento não influenciou os valores de pH dos produtos que se manteve normal ao longo de todos os períodos avaliados. Em geral, os bifes de alcatra apresentaram uma significativa elevação do pH após 7 dias de estocagem em 0,2%CO com absorvedores de oxigênio (T₂) e em 100%CO₂ (T₃). Nos períodos subsequentes, os valores de pH dos bifes de alcatra foram comparáveis ao da carne fresca. Os bifes de contrafilé apresentaram uma continua redução do pH ao longo da estocagem em AM, atingindo valor máximo de 5,58 após 21 d de estocagem.

Segundo Jakobsen & Bertelsen (2004) quando altas concentrações de CO₂ são utilizadas, pode ocorrer uma diminuição do pH dependendo da capacidade tampão da carne.

3.2 - Composição gasosa

A Tabela 1 apresenta a concentração residual de O₂ e a concentração de CO₂ no espaço-livre das embalagens durante todo o período de 21 dias de estocagem a 2°C. O tipo

de produto não influenciou significativamente a concentração de O₂ e CO₂ no espaço-livre das embalagens em nenhum dos períodos avaliados (dados não apresentados).

Tabela 1 – Concentração de oxigênio residual e de dióxido de carbono (v/v) no interior das embalagens primárias sob 0,2%CO/30%CO₂ (N₂ balanço) sem e com absorvedores de oxigênio (T₁ e T₂, respectivamente) e das embalagens de distribuição sob 100%CO₂ (T₃).

Trat	dias	O ₂			CO ₂		
		m	±	dp	m	±	dp
T ₁	0	0,6	±	0,3 ^a	28,6	±	0,6 ^{ab}
	7	0,1	±	0,1 ^b	22,7	±	0,8 ^{cd}
	14	0,0	±	0,0 ^b	22,5	±	0,5 ^{cd}
	21	0,1	±	0,1 ^b	20,8	±	3,4 ^d
T ₂	0	0,6	±	0,3 ^a	28,8	±	0,4 ^a
	7	0,0	±	0,0 ^b	24,9	±	1,2 ^{bc}
	14	0,0	±	0,0 ^b	24,7	±	0,8 ^c
	21	0,0	±	0,0 ^b	24,6	±	0,5 ^{cd}
T ₃	0	0,6	±	0,2 ^a	99,6	±	0,2 ^e
	7	1,2	±	0,1 ^c	85,6	±	2,9 ^f
	14	0,2	±	0,2 ^{ab}	83,3	±	1,1 ^{fg}
	21	0,1	±	0,0 ^b	81,2	±	2,1 ^g

m=média

dp=desvio-padrão

A concentração residual média de oxigênio imediatamente após a selagem das embalagens foi 0,6% para os três tratamentos. A remoção completa de oxigênio residual deve ocorrer o mais rápido possível nas embalagens injetadas com misturas gasosas contendo CO e altas concentrações de dióxido de carbono para evitar a formação de metamioglobina (Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999).

No espaço-livre das bandejas sob 0,2% CO + 30% CO₂ + 69,8% N₂ (T₁ e T₂) a concentração de O₂ diminuiu significativamente ($p<0,05$) a partir do 7º dia de estocagem (0,6% para 0,1-0,0%), mantendo-se praticamente constante nos períodos subseqüentes,

independente do uso de absorvedores de oxigênio. Baixas concentrações de oxigênio residual (0,1% em carne bovina e 0,5 em carne suína), são necessárias para evitar o rápido escurecimento da carne (Gill, 1996, Sørheim et al, 1997b). Esses dados indicam que o uso de absorvedores de oxigênio nas embalagens primárias não facilitou a remoção de oxigênio residual e a manutenção da atmosfera livre de oxigênio nos períodos iniciais de estocagem. No entanto, diferenças significativas foram observadas na cor sensorial das amostras de alcatra acondicionadas sem absorvedor de oxigênio (T_1) até o 3º dia de estocagem que foi revertida nos períodos seguintes quando a cor dos bifes de alcatra foi comparável ao da carne fresca. Essa descoloração transitória ocorrida nas amostras acondicionadas sem absorvedor de oxigênio indica que houve pequenas diferenças na concentração de oxigênio do espaço-livre das bandejas rígidas (PET/PEAD) utilizadas nos tratamentos T_1 e T_2 que o método de análise utilizado não foi suficientemente sensível para detectar. Beggan, Allen & Butler (2006) mostraram que os métodos cromatográficos, também podem apresentar limitações quanto à detecção de concentrações residuais de oxigênio (concentração de oxigênio < 0,1%).

No interior das embalagens de distribuição a concentração residual de O_2 aumentou significativamente de 0,6 para 1,2% durante a primeira semana de estocagem em 100% CO_2 (T_3), apesar do uso de absorvedor de oxigênio, mas diminuiu consideravelmente nos períodos subseqüentes para 0,2% (14 dias) e 0,1% (21 dias). A descoloração irreversível das amostras estocada em 100% CO_2 contrasta com os resultados anteriores obtidos por Venturini (2003). A presente descoloração provavelmente foi ocasionada pelo excesso de oxigênio residual no interior das embalagens ao longo da estocagem. Um número maior de absorvedores de oxigênio poderia ter evitado tal descoloração.

O significativo aumento de O_2 residual no espaço-livre das embalagens secundárias nos períodos iniciais de estocagem pode ser atribuído aos processos de difusão e dessorção do oxigênio ocluso nas bandejas de poliestireno expandido devido à ação de um gradiente de concentração (Tewari et al 2002). Foram usadas bandejas de poliestireno expandido para a embalagem primária da carne, pois são as embalagens predominantes na rede varejista,

para a qual se destina a tecnologia de embalagens estudada. Para estas empresas, a carne fresca continua sendo uma *commodity*, um produto com baixo valor agregado e sem diferenciação, sendo importante usar-se embalagens de baixo custo. Buscou-se, portanto, aplicar a nova tecnologia a um sistema de embalagens já largamente utilizado e familiar aos consumidores e varejistas, de baixo custo e disponível no mercado brasileiro pelos fabricantes de embalagens, o que não ocorre com as bandejas co-extrusadas, que certamente seriam as mais adequadas para a embalagem da carne em atmosfera livre de oxigênio. Assim, resultados melhores poderiam ter sido obtidos utilizando bandejas plásticas confeccionadas com outros tipos de polímeros, com melhores propriedades de barreira ou equipamentos capazes de efetuar mais de um ciclo de evacuação e injeção de gases.

Já a concentração de CO₂ nas embalagens de distribuição diminuiu significativamente ($p < 0,05$) ao longo do tempo. O volume de CO₂ diminuiu até 37,5 % nas bandejas PET/PEAD seladas com filme co-extrusado contendo EVOH (T₁ e T₂). Nas embalagens de distribuição (T₃) diminuição do nível de CO₂ foi comparativamente menor, cerca de 23,0 % após 21 dias de estocagem em AM a 2°C. Do ponto de vista prático é importante ressaltar que o efeito bacteriostático do CO₂ está relacionado à sua saturação na carne, e não à sua concentração no espaço-livre da embalagem.

Comercialmente, os equipamentos com dispositivos circulares do tipo *snorkel* especialmente desenvolvidos para executar vários ciclos de evacuação e injeção de gases e reduzir ao máximo a concentração de O₂ (<0,03%) no espaço-livre da embalagem parecem ser as melhores opções de escolha para saturar a carne com CO₂ e otimizar o efeito bacteriostático das misturas contendo CO₂ (Holley & Gill, 2005). O sistema CAPTECH (Captron, Secure Fresh Pacific, Auckland, New Zeland) é um exemplo.

3.3 - Avaliação sensorial e instrumental da cor

A Tabela 2 resume os resultados da análise de variância (ANOVA) de características sensoriais e instrumentais dos bifes de alcatra (GM) e contrafilé (LD).

Tabela 2 – Análise de variância (ANOVA) sobre as características da cor e aroma da carne estocada sob diferentes sistemas de embalagem sob AM livre de oxigênio a 2°C.

<i>Produto</i>	<i>Efeito</i>	<i>cor visual</i>	<i>% desc</i>	<i>odor</i>	<i>aparência da gordura</i>	<i>L*</i>	<i>C*</i>	<i>h*</i>
GM	Trat	*	*	*	nd	ns	*	*
	Tempo	*	*	*	nd	ns	ns	ns
	Trat x tempo	*	*	*	nd	ns	*	*
LD	Trat	*	*	*	*	*	*	ns
	Tempo	*	*	*	ns	*	*	ns
	Trat x tempo	*	*	*	*	ns	ns	ns

GM= *Gluteus medius*; LD= *Longissimus dorsi*

L* = Luminosidade;

C* = índice de saturação = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$

h* = ângulo hue = $(b^*/a^*)\text{tg}^{-1}$

*diferença significativa a $p < 0,05$

ns = não significativo

nd = não determinado

A cor visual dos bifes de alcatra e contrafilé foi afetada pelo tratamento, pelo tempo de estocagem e pela interação entre tratamento e tempo.

A cor visual e instrumental das amostras acondicionadas nas embalagens primárias em 0,2% CO (T₁ e T₂) foi estatisticamente superior a cor das amostras acondicionadas em 100% CO₂ ($p < 0,05$) durante todo o período de 21 dias de estocagem em AM a 2°C. A intensidade de vermelho (C*) na superfície dos bifes de alcatra e de contrafilé estocados em 0,2%CO foi superior ($p < 0,05$) ou similar ao da carne fresca em todos os períodos avaliados, independente do uso de absorvedores de oxigênio.

Nas amostras de alcatra acondicionadas em 0,2%CO (T₁ e T₂) a cor visual foi estatisticamente afetada por um curto período de tempo. Na Figura 2 pode-se observar uma significativa ($p < 0,05$) diminuição da cor vermelha até o 3º dia de estocagem que foi revertido nos períodos seguintes quando a cor dos bifes de alcatra foi comparável ($p < 0,05$) ao da carne fresca.

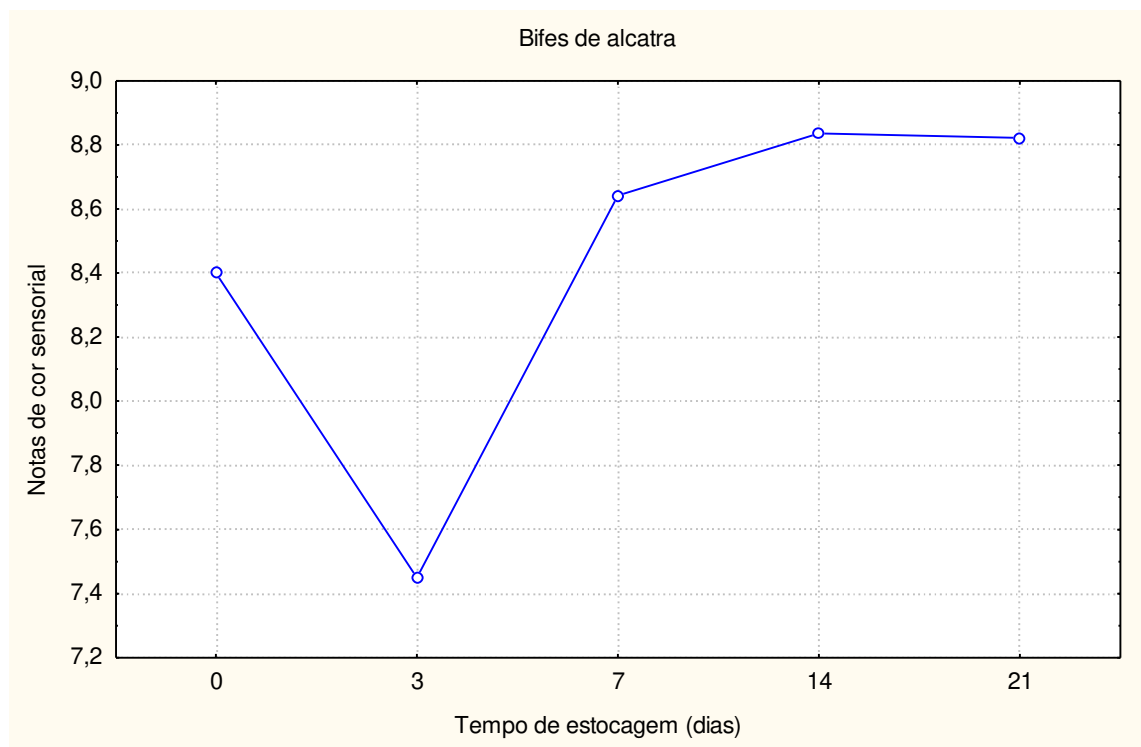


Figura 2 – Efeito do tempo de estocagem vs. cor sensorial dos bifos de alcatra acondicionados em embalagens primárias em 0,2%CO/30%CO₂/69,8%N₂, independente do uso de absorvedores de oxigênio.

Este escurecimento inicial ocorreu, muito provavelmente, porque o oxigênio residual reagiu com a mioglobina da carne, com conseqüente formação de uma camada superficial contendo uma mistura de metamioglobina, carboximioglobina e oximioglobina que conferiu aos bifos de alcatra uma tonalidade vermelha levemente mais amarronzada do que a da carne fresca.

No entanto, decorridos três dias de estocagem em AM, a metamioglobina formada nos bifos de alcatra acondicionados sem absorvedor de oxigênio foi reduzida pela ação de enzimas e cofatores originalmente presentes na carne, conferindo aos bifos uma cor vermelha típica de carne fresca em toda a superfície dos bifos (0% de descoloração). Esses resultados mostram que um período superior a três dias de estocagem pode ser requerido para a exposição da carne ao varejo com cor típica de carne fresca. Este período de tempo

pode ser inconveniente em circunstâncias comerciais, onde uma rápida distribuição da carne pré-embalada possa ser requerida, mas pode ter pouco efeito na prática, quando o produto for estocado por períodos maiores.

Esta descoloração transitória não foi observada nos bifes de contrafilé estocados sob CO (T₁ e T₂), mais estáveis à oxidação quando comparado com bifes de alcatra. O escurecimento da cor não foi evidente nos bifes de contrafilé durante a estocagem (0% de descoloração), muito provavelmente, porque a taxa de formação de metamioglobina sob concentrações residuais de oxigênio foi inferior à taxa de redução intermediada por enzimas e co-fatores necessários para reconverter a metamioglobina à deoximioglobina. A atividade de redução da metamioglobina varia bastante entre músculos (O’Keeffe & Hood, 1982). Aqueles que possuem uma alta atividade como o *Longissimus dorsi* (LD) são relativamente mais estáveis à oxidação do que os músculos que apresentam atividade intermediária como o *Gluteus medius* (alcatra).

Nos bifes de contrafilé acondicionados em 0,2% CO e com absorvedores de oxigênio (T₂), a cor visual aumentou continuamente e foi superior ($p < 0,05$) ao da carne fresca ao longo dos 21 dias de estocagem (Figura 3). Nas amostras acondicionadas sem absorvedor de oxigênio (T₁) a cor visual dos bifes de contrafilé se manteve similar ao da carne fresca até o final da estocagem.

A luminosidade (L*) dos bifes de contrafilé aumentou significativamente ($p < 0,05$) com o tempo de estocagem. Este aumento foi mais pronunciado nas amostras em 0,2% CO, onde a luminosidade foi significativamente superior à da carne fresca após 7 dias de estocagem, independente da presença de absorvedores de oxigênio. Hunt et al (2004) também observaram um aumento de luminosidade nos bifes de contrafilé e de coxão mole estocados em *masterpack* sob 0,4% CO após 21 dias de estocagem, e atribuíram a cor mais clara a maior profundidade da camada de carboximioglobina formada durante a estocagem em AM, bem como ao aumento da camada de oximioglobina que se formou, quando as embalagens primárias foram removidas da AM contendo CO para exposição ao oxigênio atmosférico. Essa suposição foi baseada no trabalho de Jayasingh et al (2001) que

observaram um aumento da profundidade de penetração do CO com o aumento do tempo de estocagem.

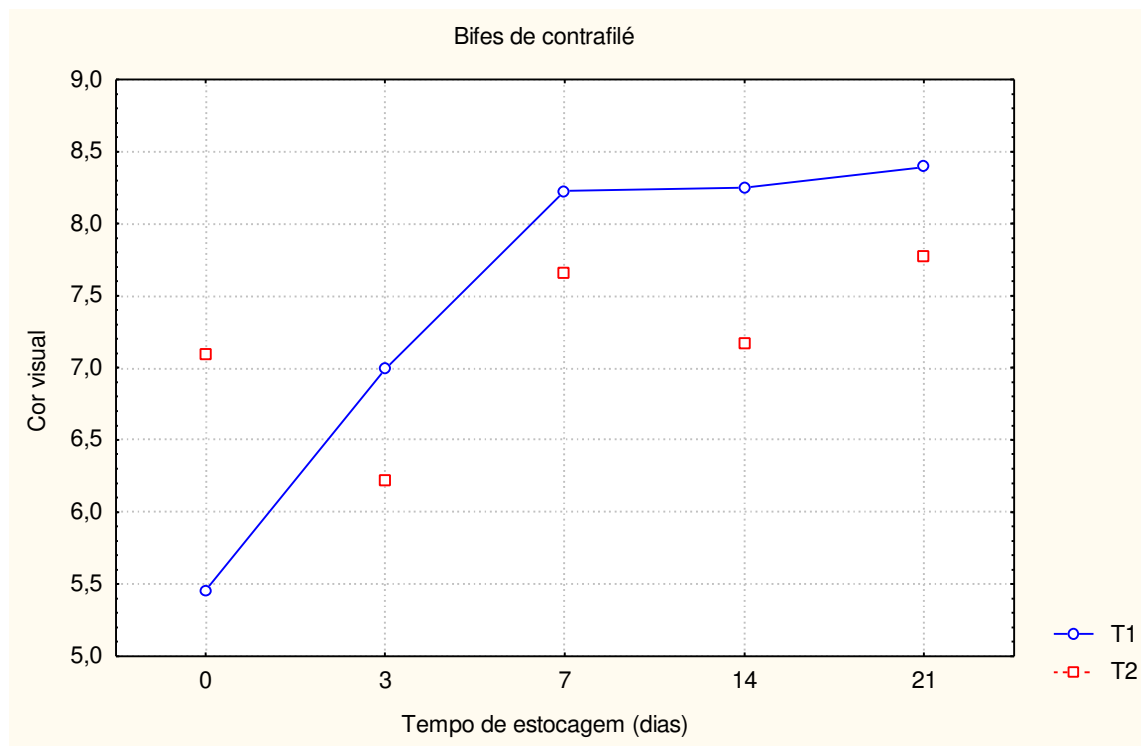


Figura 3 – Efeito da interação tratamento vs. tempo de estocagem sobre a cor sensorial dos bifes de contrafilé acondicionados em 0,2%CO/30%CO₂/69,8%N₂, sem e com absorvedores de oxigênio (T₁ e T₂, respectivamente).

A gordura do contrafilé acondicionado em 0,2% CO foi infiltrada pelo pigmento exsudado da carne, conferindo-lhe uma tonalidade rósea que influenciou positivamente na aceitação dos produtos. Mancini & Hunt (2005) ressaltaram que poucas pesquisas científicas avaliam a cor da gordura e do osso da carne bovina e suína, mesmo sabendo-se que esses dois atributos contribuem significativamente para a aparência global e definição da decisão de compra pelo consumidor.

Já a avaliação da cor visual dos bifes de alcatra e contrafilé estocados em 100%CO₂ foi prejudicada pela intensa formação de metamioglobina na superfície dos bifes (Figura 4).

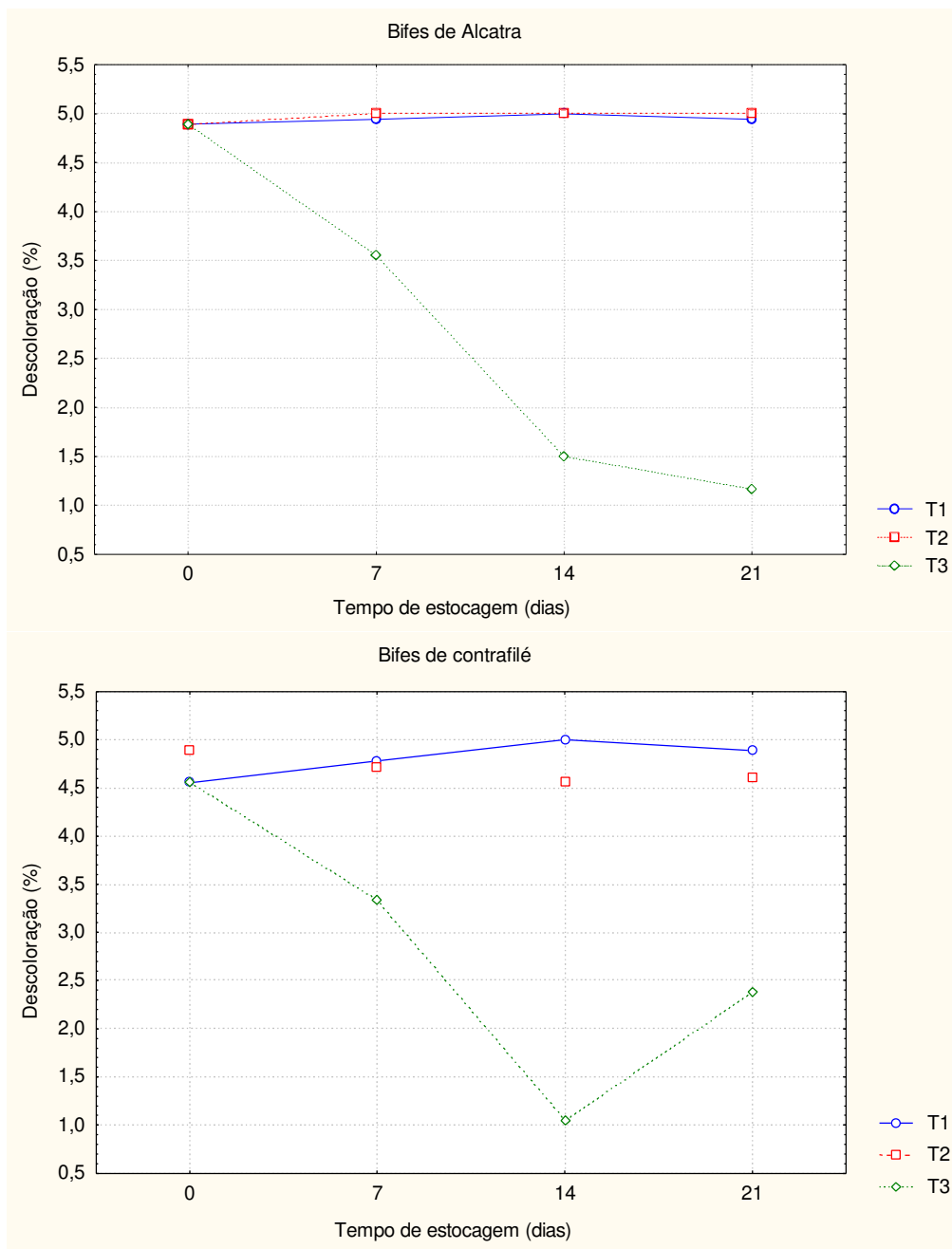


Figura 4 – Efeito do tempo de estocagem sobre a formação de metamioglobina (% de descoloração) dos bifes de alcatra e contrafilé estocados em diferentes atmosferas livre de oxigênio a 2°C.

Nas amostras de alcatra e de contrafilé estocadas em 100%CO₂ a porcentagem de metamioglobina marrom aumentou continuamente durante a estocagem, chegando a atingir mais que 60% da área superficial, após 14 dias de estocagem. Os bifes de contrafilé apresentaram tendência similar até o 14º dia de estocagem, quando então se observou uma significativa ($p<0,05$) redução da metamioglobina formada (Figura 4). A descoloração pode ser transitória, se a concentração residual de oxigênio for maior ou igual a 0,4% com *Longissimus dorsi* (LD) estocado em CO₂ a 1,5 °C (Gill & Jones, 1994a, 1994b; Gill & McGinnis, 1995), mas pode tornar-se permanente se o oxigênio residual for suficientemente alto para esgotar a atividade de redução da metamioglobina do músculo (O'Keeffe & Hood, 1980-81a; 1980-81b; 1982).

Na superfície dos bifes de alcatra estocados em 100%CO₂, onde a oxidação da mioglobina foi mais pronunciada, a mudança de cor foi acompanhada por uma redução dos valores de C* (menor intensidade de vermelho) com concomitante aumento de h* (maior intensidade de marrom) que foi estatisticamente significante ($p<0,05$). Nos bifes de contrafilé, mais estáveis à oxidação, apenas os valores de L* foram afetados estatisticamente ($p<0,05$) pela formação de metamioglobina.

Os valores de reflectância entre 400 e 700nm, confirmaram esta descoloração mais evidente observada nas amostras de alcatra estocadas em CO₂. As curvas de reflectância das amostras não foram afetadas pelo tempo de estocagem, com exceção das amostras de alcatra que apresentaram uma diminuição na reflectância entre 580 e 630 nm quando estocadas em 100%CO₂ (Figura 5), que é típica da conversão da oximioglobina a metamioglobina (AMSA, 1991). Comparando-se a curva de reflectância dos bifes de alcatra estocados em 100% CO₂ por 21 dias com as demais, é possível observar um platô entre 610nm e 630 nm, típico da oxidação da mioglobina, que não foi observado na carne fresca e nem nos produtos estocados sob CO. A razão da reflectância a 630 nm e 580 nm (630/580 nm) diminuiu significativamente de 5,4 para 1,7 após 28 dias de estocagem em 100%CO₂ ($p<0,05$). A diminuição dos valores 630/580 nm com o tempo de estocagem que

é um outro claro indicativo da oxidação da mioglobina (Mancini & Hunt, 2005; AMSA, 1991).

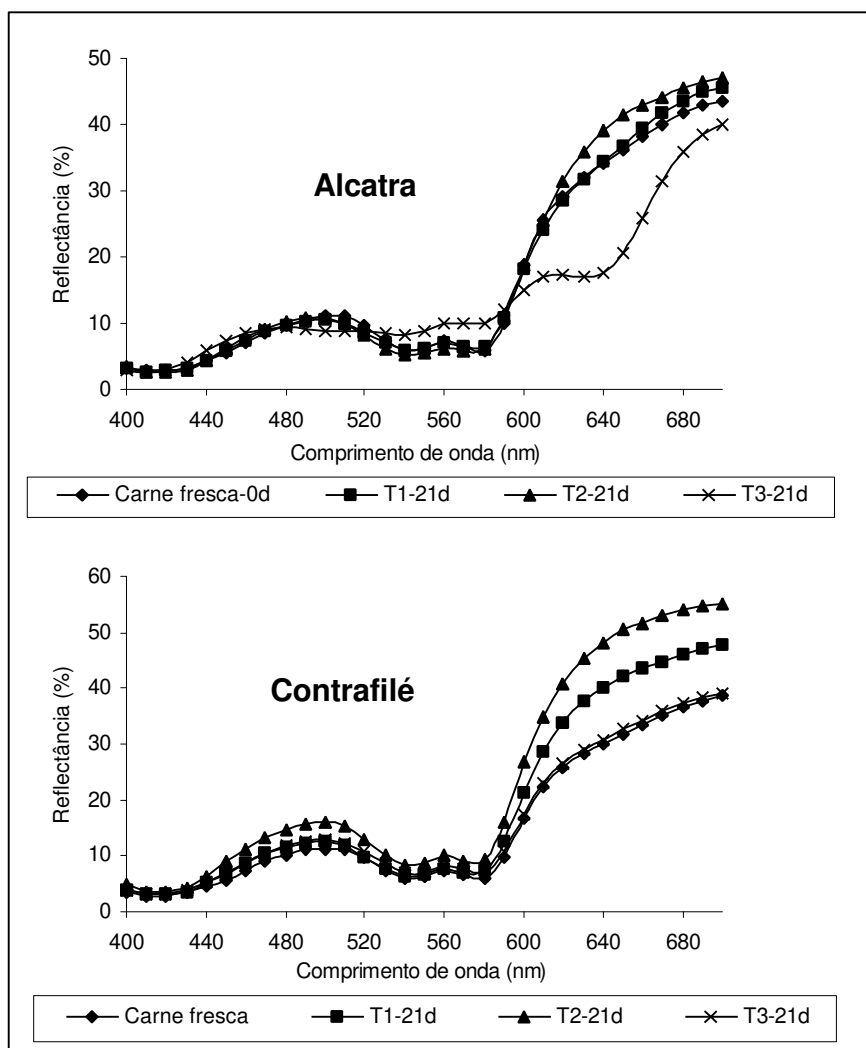


Figura 5 - Curvas de reflectância dos bifes de alcatra e contrafilé expostos somente ao ar (carne fresca) ou estocados por 21 d em 0,2%CO sem (T₁) e com (T₂) absorvedor de oxigênio e 100% CO₂ com absorvedor de oxigênio (T₃) a 1°C.

Embora haja evidências de que atmosferas contendo altas concentrações de CO₂ sejam prooxidantes podendo ocasionar a deterioração da cor e do aroma (Jakobsen &

Bertelsen, 2002), a intensa formação de metamioglobina nas amostras estocadas em 100%CO₂ provavelmente ocorreu devido à concentração de oxigênio residual (>0,1%) observado nos períodos iniciais de estocagem oriundo da bandeja de poliestireno expandido. O oxigênio residual no espaço-livre da embalagem secundária pode ter sido rapidamente absorvido pela carne antes de ser ‘seqüestrado’ pelos absorvedores de oxigênio, ocasionando o aparecimento de cor marrom a partir do 7º dia de estocagem em decorrência da formação de frações consideráveis de metamioglobina sobre a superfície da carne conforme pode ser observado nas Figuras 3 e 4. Além disso, o líquido exsudado da carne conferiu uma tonalidade marrom de aparência muito desagradável à gordura dos bifes de contrafilé em função da oxidação dos pigmentos da carne.

3.4 - Avaliação microbiológica dos bifes de alcatra e contrafilé

As contagens das bactérias psicrótróficas anaeróbicas e aeróbicas antes da embalagem da carne em AM (3 d *postmortem*) foram 3,8 log UFC/g e 3,4 log UFC/g para bifes de alcatra, respectivamente, e 3,8 log UFC/g e 3,3 log UFC/g para os bifes de contrafilé.

Os diferentes níveis de CO (0,2 ou 0,0%) ou CO₂ (30 ou 100%) das três misturas gasosas avaliadas não afetaram significativamente o desenvolvimento da microbiota nas amostras. Nenhum dos resultados apresentados em trabalhos anteriores (Luño et al, 2000; Luño, Béltran & Roncalés, 1998) apresentou qualquer diferença nas contagens de psicrótróficos aeróbicos em função da concentração de CO da atmosfera, com exceção de pequenas diferenças no crescimento de *B. thermosphacta*.

Neste trabalho, as contagens de psicrótróficos aeróbios e anaeróbios atingiram cerca de 7 log UFC/g, após 21 d de estocagem, independente da concentração de CO₂ na atmosfera (Tabela 3).

Tabela 3 – Qualidade microbiológica de alcatra sob T₁: 69,8 %N₂ / 30%CO₂ / 0,2%CO; T₂: 69,8 % N₂ / 30%CO₂ /0,2% CO + absorvedor de O₂ e T₃: 100% CO₂ + absorvedor de O₂, durante o experimento.

Microrganismo	log UFC/g											
	GM						LD					
	14 dias			21 dias			14 dias			21 dias		
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
<i>Clostridium sulfito redutor</i>	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
<i>Enterobactérias</i>	1,5	< 1,0	1,2	1,7	1,5	1,3	1,6	1,1	1,4	3,3	2,7	2,5
<i>Brochotrix termosphacta</i>	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	1,9	< 1,0	1,7	< 1,0	2,2	5,1	1,4
<i>Bactérias lácticas</i>	5,1	4,5	3,9	4,9	4,9	4,6	4,8	5,2	4,5	4,5	4,2	5,6
<i>Psicrotróficos aeróbios</i>	6,2	5,8	5,7	6,6	7,3	6,8	6,3	6,1	5,6	7,4	6,8	7,3
<i>Psicrotróficos anaeróbios</i>	5,7	5,6	5,6	6,5	7,2	6,8	6,0	5,6	5,6	7,4	6,8	7,2
<i>Salmonella</i>	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus

GM= *Gluteus medius*; LD=*Longissimus dorsi*
aus=ausente

Os produtos estocados em 0,2%CO-30%CO₂ com ou sem absorvedores de oxigênio apresentaram aroma normal, típico de carne fresca em todos os períodos de estocagem avaliados (T₁ e T₂, respectivamente) (Figura 6).

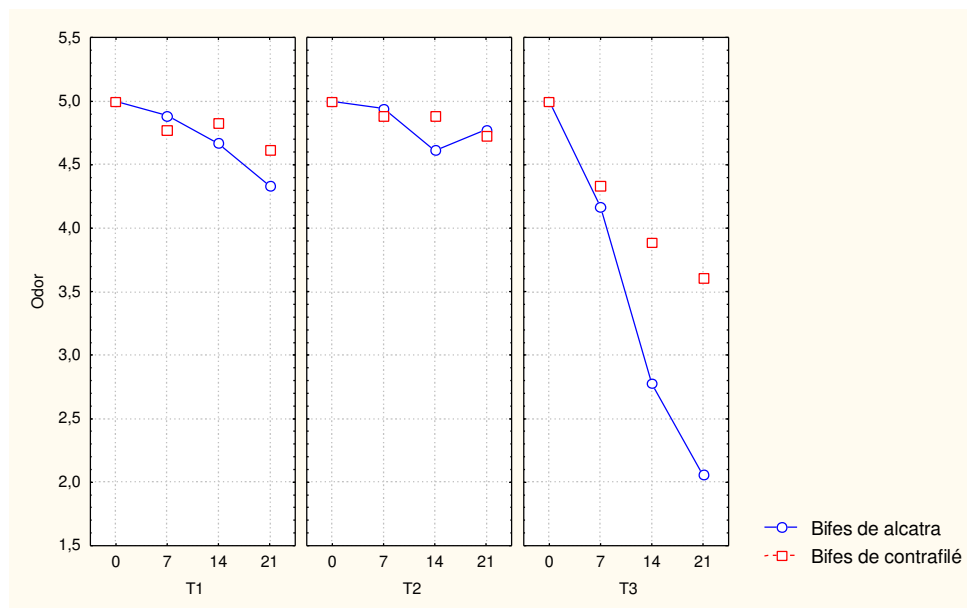


Figura 6 – Efeito da interação tratamento vs. tempo de estocagem (0, 7, 14 e 21 dias) sobre as notas de aroma dos bifes de alcatra e contrafilé.

O crescimento de psicrotróficos aeróbios e anaeróbios nas amostras de todos os tratamentos indica o desenvolvimento de uma microbiota mista composta de psicrotróficos estritos e facultativos. A presença de concentrações residuais de oxigênio em todos os tratamentos reforça esta hipótese. De acordo com Viana, Gomide & Vannetti (2005), a mensurável permeabilidade ao oxigênio através das embalagens barreira, que neste experimento foi de 0,17 mL/m²/24h a 25°C e 1 atm, pode favorecer o crescimento de anaeróbios facultativos.

Já a carne acondicionada em 100% CO₂ (T₃) apresentou um odor moderadamente desagradável após 14 dias de estocagem a 2°C (Figura 6). Segundo Gill & Jones (1994) a microbiota láctica somente confere odor desagradável à carne após atingir contagens maiores que >7 log UFC/g. Neste experimento a contagem de bactérias lácticas foi inferior a 6 log UFC/g em todos os tratamentos. *B. thermosphacta* pode alterar o aroma da carne quando seu crescimento atinge 6 log UFC/g (Gill & Harrison, 1989) e a contagem desses microrganismos não excedeu 2 log UFC/g sob 100% CO₂. Esta alteração organoléptica se deve, possivelmente, à formação de substâncias derivadas do crescimento de *Pseudomonas*,

favorecida pelas maiores concentrações residuais de oxigênio observadas ao redor destas amostras, imediatamente antes do início das análises.

Um efeito bacteriostático adicional poderia ter sido obtido com o aumento da pressão parcial de CO₂, utilizando-se temperatura próxima de 0°C (Sørheim, Nissen & Nesbakken, 1999). Isto é devido ao fato de que a solubilidade do CO₂ aumenta à medida que a carne é resfriada, até a temperatura limite para evitar o seu congelamento, ou seja, -1,5?0,5°C. (Gill & Penney, 1988).

Salmonella, *Listeria*, *Clostridium* sulfito redutor e *Staphylococcus aureus* coagulase-positivo não foram detectadas nas amostras de nenhum dos tratamentos testados. Esses resultados estão de acordo com a Resolução RDC nº12/ANVISA que estabelece o padrão microbiológico para cortes de carne bovina resfriada *in natura* e determina apenas a ausência para *Salmonella* em 25g de carne. No entanto, o trabalho de Nissen et al (2000) reforça a importância do controle da temperatura para garantir a segurança microbiológica da carne fresca embalada sob AM em condições anaeróbicas. Esses autores compararam o crescimento de várias bactérias patogênicas inoculadas em carne moída acondicionada sob três diferentes sistemas de embalagem e observaram que a 10°C algumas cepas de *Salmonella* apresentaram um crescimento relativamente superior a 0,4%CO/60%CO₂/39,6%N₂ quando comparada com a estocagem sob alta concentração de oxigênio (70%O₂/30%CO₂ ou ar).

4. CONCLUSÃO

Embora 2°C não seja a temperatura recomendada para otimizar a vida útil da carne fresca foi mais próxima da temperatura ótima (1,5°C) do que a comercialmente praticada (4°C). Portanto, melhores resultados poderiam ter sido obtidos, diminuindo-se a temperatura de estocagem.

No entanto, mesmo sob tais condições, nenhum dos produtos avaliados atingiu contagens microbiológicas acima de 7,5 log UFC/g, considerada crítica para a detecção de odores indesejáveis.

A presença de aproximadamente 0,6% de oxigênio residual, imediatamente após a termoselagem das bandejas, não afetou a avaliação sensorial e instrumental da cor e da aparência global dos produtos estocados sob CO. A aplicação de 0,2 % CO nas embalagens primárias minimizou os efeitos da concentração residual de oxigênio sobre a cor dos bifes de alcatra e contrafilé, que mantiveram aparência e aroma similares ou superiores ao da carne fresca durante os 21 dias de estocagem em AM, independente do uso de absorvedores de oxigênio. Portanto, o uso de CO eliminou a necessidade de uso de absorvedores de oxigênio nos sistemas de embalagem anaeróbica utilizados neste experimento.

A vida útil da carne estocada em embalagem de distribuição em 100% CO₂ foi limitada pela rápida descoloração observada desde os períodos iniciais de estocagem. Neste sistema de embalagem a excessiva concentração residual de oxigênio, devido ao oxigênio ocluso na bandeja de poliestireno expandido, acelerou a formação de metamioglobina marrom na superfície da carne e a percepção de odores desagradáveis, a despeito do uso de absorvedores de oxigênio. Os absorvedores de oxigênio têm potencial para prevenir a descoloração irreversível da carne estocada em 100% CO₂, mas fatores tais como tipo de embalagem primária, tipo e capacidade do absorvedor, concentração inicial de oxigênio podem afetar os resultados.

Os resultados deste experimento mostraram que o uso de 0,2% CO associado a 30% CO₂ foi capaz de eliminar os problemas de reoxigenação, que podem ocorrer sobre concentrações residuais de oxigênio e manter a qualidade microbiológica por 21 dias a 2°C. Portanto, este período de tempo possibilita a centralização das operações de embalagem da carne fresca em bandejas com identificação de origem e agregar valor ao produto, sem diminuir a segurança ao consumidor.

Estudos complementares são necessários para verificar o efeito da aplicação de 0,2% de monóxido de carbono sobre outros produtos, menos estáveis à oxidação, tais como a carne moída ou bifes de filé mignon.

Referências Bibliográficas

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION (AMSA). Guidelines for meat color evaluation. In: 44th ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE American Meat Science Association, 1991, Manhattan. **Proceedings...** Manhattan: National Live Stock and Meat Board.

BEGGAN, M.; ALLEN, P.; BUTLER, F. Oxygen scavenger effect on the development of metmyoglobin on beefsteaks during early low-oxygen storage. **Journal of Muscle Foods**, v. 17, p. 381–397, 2006.

DOWNES, F.P.; ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**, v. 43, p. 99-109, 1996.

GILL, C.O.; HARRISON, J.C.L. The storage life of chilled pork packaged under carbon dioxide. **Meat Science**. v. 26, p. 313-324, 1989.

GILL, C.O.; JONES, T. The display of retail packs of ground beef after their storage in master packages under various atmospheres. **Meat Science**, v. 37, p. 281-295, 1994a.

GILL, C.O.; JONES, T. The display of retail-packaged beef steaks after their storage in master packages under various atmospheres. **Meat Science**, v. 38, p. 385-396, 1994b.

GILL, C.O.; MCGINNIS, J.C. The effects of residual oxygen concentration and temperature on the degradation of the colour of beef packaged under oxygen-depleted atmospheres. **Meat Science**, v. 39, p. 387-394, 1995.

GILL, C.O.; PENNEY, N. The effect of the initial gas volume to meat weight ratio on the storage life of chilled beef packaged under carbon dioxide. **Meat Science**, v. 22, p. 53–63, 1988.

GILL, CO. The solubility of carbon dioxide in meat. **Meat Science**, v. 22, p. 65-71, 1988.

HOLLEY, R.A.; GILL, C.O. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. In: III Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes, 2005, Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos.

HOOD, D.E. Factors affecting the rate of metmyoglobin accumulation in pre-packaged beef. **Meat Science**. v. 4. n. 4, p.247-265, 1980.

O'KEEFFE & HOOD, D.E. Anoxic storage of fresh beef: colour stability and weigh loss. **Meat Science**, v.5, p.267-281, 1980-81a.

O'KEEFFE; HOOD, D.E. Anoxic storage of fresh beef: nitrogen and carbon dioxide storage atmospheres. **Meat Science**, v.5, p.27-39, 1980-81b.

HUNT, M.C.; MANCINI, R.A.; HACHMEISTER, D.H.; KROPF, D.H.; MERRIMAN, M.; DELDUCA, G.; MILIKEN, G. Carbon monoxide in modified atmosphere packaging affects color, shelf life, and microorganisms of beef steaks and ground beef. **Food Chemistry and Toxicology**, v.69, n.1, p.45-52, 2004.

HUTCHINGS, J.B. Chemistry of food colour. In: **Food Colour and Appearance**. Cambridge: Blackie Academic & Professional, 1994. Capítulo 10, p.401-410: Fresh meat.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. The use of CO₂ in packaging of fresh red meats and its effect on chemical quality changes in the meat: a review. **Journal of Muscle Foods**, v.13, p.143-168, 2002.

JAKOBSEN M. (2003). **Optimizing MAP of meat through modelling. Modelling colour stability and changes in headspace gas composition during storage**. Ph.D. Thesis. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. ISBN 87-7611-033-8.

JAKOBSEN, M.; BERTELSEN, G. Predicting the amount of carbon dioxide absorbed in meat. **Meat Science**, v. 68, n. 4, p. 603-610, 2004.

JAYASINGH, P.; CORNFORTH, D.P.; CARPENTER, C.E.; WHITTIER, D. Evaluation of carbon monoxide treatment in modified atmosphere packaging or vacuum packaging to increase color stability of fresh beef. **Meat Science**, v. 59, p. 317-324, 2001.

LEDWARD, D.A. Metmyoglobin formation in beef muscles as influenced by content and anatomical location. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 36, p.138-140, 1971.

LUÑO, M., BÉLTRAN, J.A. & RONCALÉS, P. Shelf-life extension and colour stabilisation of beef packaged in a low O₂ atmosphere containing CO: loin steaks and ground meat. **Meat Science**, v. 48, n. 1-2, p. 75-84, 1998.

LUÑO, M.; RONCALÉS, P.; DJENANE, D.; BELTRÁN, J.A. Beef shelf-life in low O₂ and high CO₂ atmospheres containing different low CO concentrations. **Meat Science**, v. 55, p. 413-419, 2000.

MANCINI, R.A. & HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, v. 71, p. 100-121, 2005.

MEILGAARD M.; CIVILLE G. V.; CARR, B. T. (1987). **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press.

O'KEEFFE & HOOD, D.E. Anoxic storage of fresh beef: colour stability and weigh loss. **Meat Science**, v.5, p.267-281, 1980-81a.

O'KEEFFE; HOOD, D.E. Anoxic storage of fresh beef: nitrogen and carbon dioxide storage atmospheres. **Meat Science**, v.5, p.27-39, 1980-81b.

O'KEEFFE M.; HOOD, D.E. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef from muscles of different colour stability. **Meat Science**, 7, 209-221, 1982.

RENERRE, M. Review: Factores involved in the discoloration of beef meat. **International Journal of Food Science and Technology** v.25, p.613-630, 1990.

RENERRE, M.; MAZUEL, J.P. Relations entre méthodes de mesures instrumentales et sensorielles de la couleur de la viande. **Sciences des Aliments**, v. 4, p. 567-584, 1985.

ROUSSET, S.; RENERRE, M. Effect of CO₂ or vacuum packaging on normal and high pH meat shelf-life **International Journal of Food Science and Technology**, n. 26, v. 6, p. 641-652, 1991.

SØRHEIM, O.; AUNE, T.; NESBAKKEN, T. Technological, hygienic and toxicological aspects of carbon monoxide used in modified-atmosphere packaging of meat. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, p.307-312, 1997a.

SØRHEIM, O.; ERLANDSEN, T.; NISSEN, H.; LEA, P.; H?YEM, T. Effects of modified atmosphere storage on colour and microbiological shelf life of normal and pale, soft and exsudative pork. **Meat Science** v.47 p.147-155, 1997b.

SØRHEIM, O.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide **Meat Science** v.52 p.157-164, 1999.

STRANGE E.D.; BENEDICT, R.C.; GUGGER, R.E.; METZGER, V.G.; SWIFT, C.E. Simplified methodology for measuring meat colour. **Journal of Food Science**, v.39, p.988-992, 1974.

TEWARI G, JEREMIAH LE, JAYAS, DIGVIR S, HOLLEY RA. Improved use of oxygen scavengers to stabilize the colour of retail-ready meat cuts stored in modified atmospheres. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 199-207, 2002.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USDA). GRAS notice nr GRN 000083 (2002). Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g083.html>. Acesso em: 05 jun. 2007

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USDA). GRAS notice nr GRN 000143 (2004). Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g143.html>. Acesso em: 05 jun. 2007

VENTURINI, A.C. **Embalagens de distribuição (*masterpack*) com atmosfera modificada e absorvedores de oxigênio para aumento da vida útil de carne bovina**. Piracicaba, 2003, 103p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo (USP).

VENTURINI, A.C.; CONTRERAS, C.J.C.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L. & VILLANUEVA N.D.M. The Effects of Residual Oxygen on the Storage Life of Retail-1 Ready Fresh Beef Steaks Masterpackaged under atmosphere of CO₂. **Journal of Food Science**, v.71, p.S560 - S566, 2006.

VIANA, E.S.; GOMIDE, L.A.M.; VANETTI, M.C.D. Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. **Meat Science**, v. 71, p. 696-705, 2005.

ANEXOS



Figura 1 – Bifes de alcatra estocados sob T_1 : 69,8 %N₂ / 30%CO₂ / 0,2%CO sem absorvedor de oxigênio por 21 dias a 2°C.



Figura 2 – Bifes de alcatra estocados sob T₂: 69.8 %N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO e com absorvedor de oxigênio por 21 dias a 2°C.



Figura 3 – Bifes de contrafilé estocados sob T_1 : 69.8 %N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO e sem absorvedor de oxigênio por 21 dias a 2°C.



Figura 4 – Bifes de contrafilé estocados sob T_1 : 69.8 %N₂ / 30%CO₂ / 0.2%CO e com absorvedor de oxigênio por 21 dias a 2°C.



Figura 9 – Bifes de alcatra estocados sob T_3 : 100%CO₂ e com absorvedor de oxigênio por 21 dias a 2°C.



Figura 10 – Bifes de contrafilé estocados sob T₃: 100%CO₂ e com absorvedor de oxigênio.

CAPÍTULO 4

EMBALAGEM DE DISTRIBUIÇÃO COM ATMOSFERA MODIFICADA PARA CARNE BOVINA FRESCA CONTENDO 0,2% DE MONÓXIDO DE CARBONO (CO) E ALTAS CONCENTRAÇÕES DE DIÓXIDO DE CARBONO (CO₂)

Bifes de miolo de alcatra (*gluteus medius*), contrafilé (*longissimus dorsi*), filé mignon (*psoas major*) e carne moída (*triceps brachii*) foram porcionados em bandeja de poliestireno expandido que foram envoltas por filme de policloreto de vinila. Um conjunto de quatro bandejas de cada corte foi acondicionado em embalagem de distribuição em atmosfera anaeróbica contendo 0,2%CO / 60,0%CO₂ / 39,8%N₂ e 0,2%CO / 99,8%CO₂. As embalagens de distribuição foram estocadas por 7, 14, 21 e 28 dias a 1°C. A cada período de estocagem, quatro bandejas do mesmo produto foram retiradas aleatoriamente de duas embalagens de distribuição contendo a mesma atmosfera para análise de composição gasosa, pH, cor instrumental e sensorial, aroma, aparência global, determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e desenvolvimento da microbiota. Uma descoloração transitória entre o 7º e o 21º dia de estocagem foi observada nos bifes de filé mignon, mais sensíveis à oxidação sob concentrações residuais de oxigênio. Após 28 dias de estocagem sob 0,2%CO/60%CO₂/39,8%N₂, a cor sensorial e instrumental de todos os bifes e da carne moída foi superior ou similar ao da carne fresca. Aparência e odor menos agradáveis foram perceptíveis na carne moída e nos bifes de filé mignon no período final de estocagem em AM, mas somente após 48h de exposição aeróbica a 4°C. *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* sulfito redutor não foram detectados em nenhuma das amostras e a contagem de bactérias psicotróficas foi inferior a 7,5 log UFC/g.

Palavras-chave: carne bovina, embalagem em atmosfera modificada, monóxido de carbono, carboximioglobina, cor.

SUMMARY

Steaks from *gluteus medius m.*, *longissimus dorsi m.*, *psoas major m.*, and ground beef (*triceps brachii*) were packed on expanded polystyrene tray and overwrapped with polyvinyl chloride film. Four trays of each product were placed in masterpack under anoxic atmosphere containing 0,2%CO / 60,0%CO₂ / 39,8%N₂ e 0,2%CO / 99,8%CO₂. All masterpacks were stored for 28 days at 1°C. Each seven days, four trays for each product were removed randomly from two masterpacks containing the same atmosphere for analysis of gas composition, pH, visual and instrumental colour, odour, global appearance, odour, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) determination and microbiota. Steaks from *psoas major* of low colour stability at low concentrations of oxygen, underwent one cycle of transient discolouration from 7 to 21 days of storage. After storage for 28 days, visual and instrumental colour of beef steaks and ground beef were similar or superior ($p < 0,05$) to fresh meat. The display of the ground beef and the steaks from *psoas major* was limited by off-odour 48 h after air exposure at 4°C. Pathogenic bacteria such as *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and sulphite-reducing *Clostridium* were not detected in any samples tested and the levels of psychrotrophic counts were lower than 7,5 log UFC/g.

Keywords: beef, modified atmosphere packaging, carbon monoxide, carboxymyoglobin, colour, odour.

1 - INTRODUÇÃO

A vida útil da carne bovina fresca acondicionada em embalagens tradicionais (bandejas de poliestireno expandido envoltas por filme de PVC) é limitada por processos oxidativos e microbiológicos que alteram a aparência e a qualidade da carne refrigerada a poucos dias, dependendo do tipo de corte e da temperatura de estocagem.

A variabilidade intermuscular é o fator isolado mais importante na estabilidade da cor da carne, excluindo-se a possibilidade de contaminação bacteriana (Hood, 1980). Tecidos musculares deficientes em enzimas ou cofatores necessários para a redução da forma oxidada são incapazes de reverter a metamioglobina, que persiste uma vez formada. Diferentes tecidos musculares podem apresentar diferentes capacidades de redução da metamioglobina. Músculos com maior capacidade de redução apresentam coloração relativamente mais estável, quando expostos ao ar (O'Keefe & Hood, 1980-81a).

Segundo Ledward (1971), a susceptibilidade quanto à formação de MetMb no músculo é dada por: *Biceps femoris* (picanha) > *Semimembranosus* (coxão mole) > *Longissimus dorsi* (contrafilé) = *Semitendinosus* (lagarto). Similarmente, O'Keefe & Hood (1982) observaram que a variabilidade intermuscular foi o fator mais importante na instabilidade da cor de carne bovina pré-embalada e encontraram a seguinte ordem de estabilidade para os músculos estocados em temperaturas entre 0 e 10°C: 1º) *Longissimus dorsi* (contrafilé), 2º) *Semimembranosus* (coxão mole), 3º) *Gluteus medius* (alcatra), 4º) *Psoas major* (filé mignon), sendo este último, o músculo mais susceptível à oxidação do pigmento.

Embalagens de distribuição em atmosfera anaeróbica contendo altas concentrações de dióxido de carbono é usada para estender a vida útil da carne fresca, principalmente antes da exposição ao varejo, já que a cor púrpura da carne estocada em atmosfera livre de oxigênio não é tão bem aceita pelo consumidor que associa a cor vermelha da oximioglobina ao frescor e à qualidade do produto (Hunt et al, 2004).

O CO₂ possui efeito bacteriostático e fungistático. No entanto, a aplicação de altas concentrações de CO₂ pode afetar negativamente a qualidade química da carne. Após a absorção, o CO₂ é solubilizado com formação de ácido carbônico que pode provocar a acidificação da carne. A diminuição do pH pode tanto aumentar a velocidade dos processos de oxidação de pigmentos e lipídica como também diminuir a capacidade de retenção da água (Jakobsen & Bertelsen, 2002).

Os equipamentos disponíveis comercialmente para modificação de atmosfera podem reduzir a concentração de oxigênio a 0,5% (Belcher, 2006). E a taxa de oxidação da deoximioglobina à metamioglobina aumenta exponencialmente com a diminuição da pressão de oxigênio (Renner, 1990). Níveis de oxigênio residual acima de 0,1% para carne bovina e 0,5% para carne suína, são capazes de oxidar a cor da carne irreversivelmente (Gill, 1996; Sørheim et al 1999). Para estabilizar a cor da carne embalada em atmosferas livres de oxigênio é necessário atingir rapidamente concentrações de oxigênio menores do que 0,1% utilizando absorvedores de oxigênio.

A adição de absorvedores de oxigênio associados às baixas concentrações de monóxido de carbono pode eliminar os problemas de descoloração que ocorrem sob concentrações residuais de oxigênio, particularmente em músculos que apresentam dificuldade em reduzir a metamioglobina (marrom) à deoximioglobina, bem como a de oxigenar a deoximioglobina (Hunt et al, 2004; Sørheim et al, 1999).

Luño et al (2000) mostraram que 0,75% CO foi o limite crítico para prevenir a formação de metamioglobina de *Longissimus lumborum* acondicionado em embalagens primárias contendo 50%CO₂ + 24%O₂ por 29 dias a 1°C.

Sørheim et al (1999) reportaram que o uso de CO torna dispensável a adição de oxigênio à embalagem primária. Esses autores mostraram que a mistura gasosa contendo 0,4% CO + 60%CO₂ + 39,6N₂ adicionada na embalagem primária foi capaz de estender a cor da carne moída e de bifes de *Longissimus dorsi* refrigerados a 4°C que tiveram a vida

útil limitada por uma evidente alteração de odor que ocorreu após 11 e 14 dias, respectivamente.

Segundo Seyfert et al (2007), a inclusão de 0,4% CO com 20 ou 80% de oxigênio não tem nenhum impacto sobre a cor. Acredita-se que o CO possa ser incapaz de dissociar o oxigênio ligado à mioglobina e que, portanto, a carboximioglobina somente pode se formar quando o CO se liga à mioglobina nativa (Mancini & Hunt, 2005). O trabalho de Hunt et al (2004) reforça esta hipótese. Segundo esses autores a cor da carne estocada em 0,4%CO + 30%CO₂ + 69,6%N₂ em embalagens de distribuição e exposta ao varejo em embalagens convencionais, permeáveis ao ar, se deteriora na mesma velocidade que a carne fresca exposta somente ao ar. O ponto chave deste sistema, segundo Sørheim et al (1999), é que a insignificante quantidade residual de CO presente no produto exposto ao ar não tem nenhum efeito funcional na carne exposta para a venda.

Uma possível desvantagem do uso do CO para a embalagem da carne é o mascaramento das condições microbiológicas, uma vez que a cor vermelha da carboximioglobina se mantém estável a despeito da baixa qualidade microbiológica da carne (Kropf et al, 1985). O trabalho de Jayasingh et al (2001) reflete essa preocupação. Os autores concluíram que a alta estabilidade da cor da carne moída acondicionada sob 0,5% de CO pode exceder a vida útil microbiológica, com risco de mascarar a deterioração da carne (>10⁶ UFC/g) após 5 semanas de estocagem a 2°C.

A contaminação microbiológica da carne fresca sempre foi uma importante preocupação para a segurança alimentar. Não somente a contaminação por microrganismos patogênicos que, potencialmente, podem oferecer risco à saúde humana, mas também a contaminação por microrganismos deteriorantes, que podem alterar as características sensoriais da carne, podendo causar enormes perdas econômicas, tanto para produtores como para os consumidores. *B. thermosphacta* é o microrganismo deteriorante predominante da carne embalada sob condições anaeróbicas (Grau, 1980), e a presença de *Salmonella* é o microrganismo de maior preocupação para a saúde pública (CDC, 2007).

Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se a embalagem de distribuição sob altas concentrações de CO₂ associado a 0,2% CO é capaz de estender a qualidade microbiológica e a estabilidade da cor de vários cortes de carne bovina por 28 dias a 1 ? 1°C. Os músculos *Gluteus medius* (GM), *Longissimus dorsi* (LD), *Triceps brachii* (TB) e *Psoas major* (PM) foram escolhidos por seu interesse econômico e por apresentarem diferenças intrínsecas de estabilidade de cor entre si.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Matéria-prima

Os músculos *Gluteus medius* (GM), *Longissimus dorsi* (LD), *Triceps brachii* (TB) e *Psoas major* (PM) com pH normal ($<5,8$) foram desossados 72h após o abate convencional no Frigorífico Angelelli Ltda localizado na cidade de Piracicaba - São Paulo. Os músculos foram removidos de meias carcaças ($n=12$) de touros jovens da raça Nelore, criados em pasto com até dois dentes incisivos e gordura de cobertura entre 1 e 3 mm de espessura. Bifes (1,5 cm de espessura) de alcatra (GM), contrafilé (LD) e filé mignon (PM) foram cortados transversalmente, enquanto que a paleta (TB) com 5% de gordura foi moída em discos de 4 mm na planta piloto do Departamento de Agroindústria e Nutrição da ESALQ, Piracicaba – São Paulo .

2.2 – Sistema de embalagem

Porções de aproximadamente 300 g de carne foram acondicionadas em bandejas rasas de poliestireno expandido (modelo 3RR, Cryovac[?], Sealed Air, São Paulo, SP) contendo um absorvente de líquido (Dri-loc[?], Cryovac[?], Sealed Air, São Paulo, SP). As bandejas foram envoltas por filme de policloreto de vinila (Vitafilm, Goodyear[?], São Paulo, SP) de alta permeabilidade ao oxigênio ($TPO_2 = 10.255 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{m}^2 * 24 \text{ h}$) e espessura nominal de 12 μ m.

Um conjunto de quatro bandejas do mesmo corte foi colocado aleatoriamente em sacos co-extrusados de alta barreira ao oxigênio, denominados comercialmente como *masterpack* (polietileno/poliamida/copolímero de etileno e álcool vinílico/poliamida/polietileno), $TPO_2 = 0,17 \text{ cm}^3 \text{ O}_2 / \text{m}^2 * 24\text{h}$, Unipac Embalagens Ltda, São Paulo, SP). Antes da termoselagem, dez sacos de cada produto foram evacuados e preenchidos com aproximadamente 2 L das seguintes misturas gasosas: (1) 0,2% CO, 60% CO₂ e 39,8% N₂ ou (2) 0,2% CO e 99,8% CO₂. A composição gasosa dos cilindros foi certificada pela AGA (Linde Group, São Paulo, SP).

Cinco sachês absorvedores de oxigênio (FT200, O-Buster²; Hsiao Sung Non-Oxygen Chemical Co., Ltd., Taiwan) foram colocados em cada saco. Cada sachê tinha a capacidade nominal de absorver 200cm³ de oxigênio residual do espaço-livre da embalagem. Os absorvedores foram utilizados para prevenir o escurecimento da carne que poderia ocorrer devido à rápida formação de metamioglobina marrom sobre a superfície da carne bovina exposta às concentrações de oxigênio maiores que 0,1% (Tewari, Jayas, Jeremiah & Holley, 2001; Isdell, Allen, Doherty & Butler, 1999; Gill & McGinnis, 1995).

Quatro bandejas de cada produto permaneceram expostas ao oxigênio atmosférico para a análise da carne fresca.

As embalagens de distribuição contendo os produtos em atmosfera modificada foram estocados a 1,0°C ? 0,5°C por 7, 14, 21 e 28 dias. Após cada período de estocagem, as bandejas foram removidas dos sacos e colocadas em um expositor a 4°C ± 2°C por até 48h. As bandejas foram iluminadas por 12h com lâmpadas fluorescentes que emitiam uma luminosidade média de 1237 lux, que foi medida utilizando-se um fotômetro portátil digital (MLM 1332, Minipa Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP).

2.3 - Composição gasosa

As concentrações de dióxido de carbono e oxigênio no espaço-livre dos sacos foram avaliadas durante o processamento e após cada período de estocagem, imediatamente antes da sua abertura para a retirada das bandejas.

As avaliações foram realizadas utilizando-se um analisador de gases portátil (CheckPoint[®], PBI Dansensor A/S, Ringsted, Denmark). A mistura gasosa do espaço-livre foi coletada com uma seringa hermética através de um septo de silicone colado à superfície da embalagem de distribuição. Os valores médios foram expressos em porcentagens de dióxido de carbono e oxigênio (v/v).

2.4 - Avaliação do pH

O pH foi medido diretamente na superfície da carne através de um eletrodo de punção (DM2, Digimed, São Paulo, SP-Brazil) acoplado a um potenciômetro portátil (Oakton² Instruments, Vernon Hills, IL). Foram realizadas quatro medidas por bandeja.

2.5 - Análise microbiológica

A caracterização microbiológica da matéria-prima foi realizada antes da embalagem dos produtos ($t = 0d$) e durante a estocagem em atmosfera modificada através da contagem de bactérias psicrotróficas aeróbias, bactérias lácticas, enterobactérias, *Salmonella sp.*, *Clostridium Sulfito Redutor*, *Listeria monocytogenes* e *Brochothrix thermosphacta*. Diluições decimais seriadas apropriadas foram preparadas e cada amostra foi plaqueada em duplicata. Todas as placas foram incubadas segundo as metodologias Downes & Ito (2001). As contagens foram expressas como log UFC/g.

2.6 - Análise sensorial

Antes do início dos testes sensoriais, foram realizadas cinco sessões de treinamento para familiarizar os provadores com os atributos e as escalas utilizadas, de acordo com a metodologia sugerida por Meilgaard, Civille & Carr (1987). Imagens fotográficas da carne bovina estocada sob AM foram utilizadas como referências. Durante as sessões de treinamento foram recrutados doze provadores com motivação e disponibilidade para participar de todo o experimento.

A luz fluorescente foi padronizada para iluminar as amostras em todas as sessões de análise, para não mascarar a aparência e minimizar a fotoxidação. A luz incandescente pode aumentar a aceitabilidade da cor da carne bovina e suína porque seu espectro possui mais energia nos comprimentos de onda do vermelho, considerando-se que a luz fluorescente não emite radiação luminosa mensurável na região do vermelho. (Mancini & Hunt, 2005).

Em princípio os atributos sensoriais foram avaliados utilizando as escalas sugeridas pela AMSA (1991), mas ao longo das sessões as escalas sofreram alguns ajustes sugeridos pela equipe de provadores. O atributo “cor da carne” foi avaliado através de uma escala não-estruturada de 9cm, ancorada nos extremos com os seguintes termos descritivos: 0cm = marrom acinzentado; 4,5cm = vermelha amarronzada; 9cm = vermelha típica de carne fresca. Para “Porcentagem de mancha” da carne foi utilizada uma escala mista de cinco pontos onde: 5 = nenhuma (0%); 4 = leve (1-10%); 3 = pequena (11-20%); 2 = moderada (21-60%); 1 = intensa (61-100%). O “odor desagradável” da carne foi avaliado através de uma escala estruturada de cinco pontos onde 5 = nenhum odor/aroma normal; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável. O ponto mediano de cada escala foi considerado o limite para a aceitabilidade do produto em relação ao atributo avaliado, ou seja, após atingir esta nota o produto não se encontrava atrativo, tendo perdido seu valor comercial.

2.7 - Cor instrumental

As medidas foram realizadas na superfície da carne coberta com filme PVC transparente, 30 minutos após a abertura das bandejas e exposição da carne ao ar, utilizando um espectrofotômetro portátil (MiniScan[®] XE Plus, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA) conectado a um computador equipado com o Software Universal, versão 4.10. O espectrofotômetro foi calibrado de acordo com as recomendações do fabricante e padronizado para operar com as seguintes especificações: diâmetro de abertura de 2 cm, ângulo de observação 10° e iluminante D65. As coordenadas CIE $L^*a^*b^*$, o índice de saturação da cor (C^*) = $[(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}]$ e ângulo-hue (h^*) = $\text{tg}^{-1}(b^*/a^*)$ das amostras foram obtidos pela movimentação do aparelho, em quatro posições diferentes, de tal forma que toda a superfície disponível da carne fosse amostrada. As amostras foram avaliadas em duplicata.

2.8 - Oxidação lipídica

O método de extração usado para a determinação de TBARS na carne foi o proposto por Vyncke (1970, 1975) com as modificações sugeridas por Sørensen and Jørgensen (1996). O método da extração foi o escolhido para estimar a oxidação lipídica nas amostras de carne, porque além de não expor a carne ao aquecimento, é mais rápido e fácil que os métodos de destilação, e o método recomendado quando um grande número de amostras precisa ser analisado rapidamente (Ulu, 2004).

Para a extração, 10 g de cada amostra foi homogeneizada (13.500 rpm, 30 s, 20 °C) com 15 mL de uma solução aquosa de ácido tricloroacético a 7,5%, com adição de 0,1% de propil galato e 0,1% EDTA (solução de TCA) em um homogeneizador Ultra-Turrax T-25 (Janke & Kunkel, Staufen, Germany). Após filtração, 5,0 mL do extrato foi misturado com 5,0 mL da solução aquosa de TBA (0,02 M) em tubos rosqueados colocados em banho-maria a 100 °C por 40 min e resfriados em água fria por 10 minutos. A concentração de TBARS foi calculada a partir da diferença de absorbância, medida a 532 nm e 600 nm (HP 8452A Diode Array Spectrophotometer; Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Os resultados foram expressos como mg malonaldeído por quilo de carne e calculados a partir das curvas de calibração construídas com concentrações conhecidas de malonaldeído. O padrão utilizado foi o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP).

2.9 - Análise estatística

Após cada período de estocagem foram abertos dois sacos por tratamento contendo ao todo oito bandejas do mesmo produto. Então as bandejas envoltas por PVC foram expostas aleatoriamente ao oxigênio atmosférico em um expositor refrigerado a temperatura 4 ± 2°C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial 2 x 4 x 4 x 2: duas bandejas por tratamento (T₁: 39,8 %N₂ / 60%CO₂ / 0,2%CO; T₂: 99,8 %CO₂ / 0,2%CO), quatro produtos (bifes de alcatra, contrafilé, filé mignon e carne moída de paleta) e duas replicações de todo o experimento. As médias dos tratamentos foram calculadas por análise de variância (ANOVA) utilizando Statistica?

software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo cálculo do Teste de Tukey. O nível de significância usado para todas as análises estatísticas foi 5%.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Composição gasosa no espaço-livre das embalagens de distribuição

Apesar do uso de absorvedores de oxigênio, a concentração residual de oxigênio foi mensurável durante os 28 dias de estocagem a 1°C, conforme pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição gasosa média (%) no espaço-livre das embalagens de distribuição imediatamente antes da abertura dos sacos, após cada período de estocagem em atmosfera modificada a 1°C.

Tratamento	Tempo de estocagem (dias)	O ₂ (%)		CO ₂ (%)	
		média	dp	m	dp
T ₁	0	1,20	0,23	60,10	0,58
	7	0,75	0,61	38,19	0,79
	14	0,37	0,45	38,06	0,88
	21	0,03	0,05	37,40	0,75
	28	1,04	0,09	44,44	0,09
T ₂	0	2,40	0,19	94,00	0,11
	7	2,53	0,49	60,72	0,40
	14	0,77	0,70	66,10	0,35
	21	0,93	0,17	63,72	0,85
	28	2,82	0,87	63,08	0,72

A concentração de oxigênio em T₂ foi estatisticamente superior a de T₁ ($p < 0,05$) desde a selagem das embalagens ($t = 0$ dia). Após 7 dias de estocagem a concentração de oxigênio aumentou no sistema de embalagem T₁, e oscilou nos períodos subsequentes atingindo valores máximos após 28 dias de estocagem. Esta variação foi, provavelmente, consequência da ação de um gradiente de concentração entre o espaço-livre e a estrutura de

espuma das bandejas de poliestireno expandido. A descoloração transitória observada na carne moída e nos bifes de filé mignon nos três primeiros dias de estocagem, independente do tratamento, provavelmente ocorreu em função do oxigênio residual excessivo.

A concentração de CO₂ nos sacos de ambos os tratamentos diminuiu cerca de 35% em relação ao valor inicial após 7 dias de estocagem. A atmosfera de estocagem foi reduzida de 60% para aproximadamente 40% de CO₂ em T₁ e de 99,8 para cerca de 60% de CO₂ para T₂ até o 21^o dia de estocagem. Sorheim et al (1999) observaram uma redução relativamente menor, em torno de 15% após 2-3 dias de estocagem. Um efeito bacteriostático maior poderia ter sido obtido neste experimento se o volume de CO₂ injetado tivesse sido suficiente para saturar a carne e manter a composição gasosa em equilíbrio no espaço-livre (Gill & Penney, 1988, Penney & Bell, 1993). A relação entre volume de gás e massa de carne poderia ter sido otimizada utilizando equipamentos capazes de efetuar mais de um ciclo de evacuação/injeção, o que não foi possível com o equipamento utilizado neste experimento que opera com um único ciclo, e que só permitiu ajustes na pressão e no tempo de injeção dos gases.

3.2 - Cor inicial e pH

Inicialmente (t = 0 dia) todos os produtos apresentaram aparência agradável e sem sinais evidentes de descoloração. A carne moída e bifes de filé mignon receberam notas sensoriais estatisticamente inferiores ao dos bifes de alcatra e contrafilé que apresentaram cor vermelha típica de carne fresca. As notas sensoriais recebidas pelas amostras de carne moída e filé mignon indicaram que a cor superficial dessas amostras se situava entre o vermelho típico da carne fresca e o vermelho amarronzado (considerado o limite da aceitabilidade pela equipe sensorial).

Os valores de pH dos bifes de alcatra, contrafilé e filé mignon expostos ao ar (antes da embalagem em AM) variaram de 5,6 a 5,7, o que indica que o pH não deve ter exercido nenhum efeito sobre a cor dos bifes. A paleta, no entanto, apresentou pH médio de 5,9. A

cor vermelha escura deste músculo foi provavelmente resultado do $\text{pH} > 5,8$, característico de carne seca, dura e escura (DFD).

O tratamento influenciou os valores de pH: nos produtos acondicionados em 0,2%CO-60%CO₂ o pH foi geralmente inferior ($p < 0.05$) ao dos produtos acondicionados em 0,2%CO-99,8%CO₂.

Durante a estocagem sob AM o pH médio de todos os produtos foi normal ($< 5,8$) exceto o do filé mignon que apresentou valores de pH superiores a 5,8 após 21 dias de estocagem sob 0,2%CO-99,8 %CO₂. O pH do filé mignon deve ter sido afetado pelo crescimento significativo de psicotróficos aeróbios, bactérias lácticas e *B. thermosphacta* ao longo da estocagem ($p < 0.05$). Já o pH da carne moída sofreu um rápido declínio durante AM, chegando a atingir 5,2 após 28 d de estocagem sob 0,2%CO-60%CO₂. Os bifes de alcatra e contrafilé não sofreram variação significativa do pH em função do tratamento ou do tempo de estocagem em AM. Segundo Jakobsen & Bertelsen (2002) quando altas concentrações de CO₂ são utilizadas, pode ocorrer uma diminuição do pH dependendo da capacidade tampão da carne. Neste experimento a acidificação somente foi significativa na carne moída que em média apresentou valores de pH mais altos do que as demais amostras. Isto provavelmente ocorreu devido a maior solubilidade do CO₂ na carne com pH elevado, como observado também por Rousset & Renner (1991). Anteriormente, Gill (1988) já havia relatado que a solubilidade do CO₂ em pH 5,5 (950 mL.kg⁻¹) foi relativamente menor do que em pH 6,2 (1150 mL kg⁻¹).

3.3 - Análise microbiológica

A análise microbiológica da carne fresca, antes da embalagem, mostrou que as bactérias psicotróficas aeróbicas dominavam a microbiota dos produtos (4,2-4,9 log UFC/g). A contagem de bactérias lácticas da carne moída (3,9 log UFC/g) e do filé mignon (3,4 log UFC/g) foram relativamente maiores que a dos bifes de alcatra e contrafilé (2,4 log UFC/g). O número de *B. thermosphacta* nos produtos foi menor que 2,7 log UFC/g, enquanto que o número de enterobactérias não excedeu a 3,5 log UFC/g.

Durante a estocagem em AM, as bactérias psicrotróficas aeróbicas continuaram predominando a microbiota de todos os produtos. Na primeira semana de estocagem, a carne moída sob 0,2%CO-99,8%CO₂ apresentou cerca de 4,0 log UFC/g de microrganismos psicrotróficos aeróbios, quantidade comparável à da carne fresca (t = 0 dia), enquanto que as amostras estocadas em 0,2%CO-60%CO₂ apresentaram contagens próximas a 6,0 log UFC/g ($p < 0.05$). Este maior efeito bacteriostático observado na carne moída em 99,8% de CO₂ deve estar relacionado à maior velocidade de absorção do CO₂ obtida através da moagem da carne, resultando em maior área superficial de absorção (Jakobsen & Bertelsen, 2004). No entanto, a estocagem em 99,8% CO₂ não resultou em qualquer extensão da vida útil da carne moída. Já na segunda semana em 99,8% de CO₂, a contagem de psicrotróficos aeróbios aumentou dois ciclos logarítmicos, atingindo contagens máximas próximas a 7,0 log UFC/g, comparáveis às das amostras submetidas a 60%. De acordo com Luño, Béltran & Roncalés (1998), log 7,5 UFC/g é o ponto para que haja percepção de odores desagradáveis.

Já as amostras de filé mignon apresentaram um crescimento de psicrotróficos aeróbios significativamente superior ao da carne fresca, desde a primeira semana de estocagem, e atingiram contagens próximas de 7,5 log UFC/g após 28 dias de estocagem, independente do tratamento. Estes resultados coincidem com o limiar para a percepção de odores desagradáveis, o que foi confirmado pela análise sensorial, onde o odor do produto foi considerado pouco agradável.

Os bifes de alcatra e contrafilé apresentaram contagens de psicrotróficos aeróbicos similares ao da carne fresca durante todo o tempo de estocagem avaliado, independente da concentração de CO₂ presente na mistura gasosa durante a estocagem em AM.

De maneira geral, a concentração de CO₂ na atmosfera das embalagens não afetou o crescimento das bactérias lácticas. Nas amostras de carne moída e filé mignon o número de bactérias lácticas foi cerca de 2 ciclos logarítmicos superior ao da carne fresca, e atingiram valores próximos de 6,0 log UFC/g ao final da estocagem. Já nas amostras de alcatra e contrafilé, as contagens de bactérias lácticas foram geralmente similares a da carne fresca em

ambos os tratamentos, com exceção dos bifes alcatra estocados em 0,2%CO-99,8%CO₂, que chegaram a alcançar 4,3 log UFC/g. Apesar da aparente insensibilidade das bactérias lácticas ao CO₂, esta microbiota láctica, provavelmente não conferiu odor desagradável à carne, nem mesmo nas amostras de carne moída e nos bifes de filé mignon, onde seu crescimento foi mais expressivo. As bactérias lácticas só conferem odor desagradável à carne algum tempo após terem excedido 7 log UFC/g (Gill & Jones, 1994).

Gill & Harrison (1989) descreveram que *B. thermosphacta* produz um aroma ligeiramente ácido à carne embalada a vácuo quando o crescimento desta bactéria atinge 6 log UFC/g. Neste experimento somente os bifes de filé mignon atingiram contagens próximas a esse valor (5,5 UFC/g) durante a estocagem em altas concentrações de CO₂ (60 ou 99,8%). Nas amostras de carne moída o número de *B. thermosphacta* foi sempre inferior a 5,0 log UFC/g, enquanto que nos bifes de alcatra e contrafilé não ultrapassou 3,0 log UFC/g.

Teoricamente, atmosferas livres de oxigênio deveriam favorecer o desenvolvimento de uma microbiota composta exclusivamente por bactérias lácticas (Gill 1996). No entanto, a concentração residual de oxigênio durante a estocagem aparentemente favoreceu o desenvolvimento de uma microbiota mista, composta por bactérias psicrótróficas anaeróbias facultativas ou microaerófilas, tais como *B. thermosphacta*, bactérias lácticas e as enterobactérias, como pode ser observado nas Figuras 1-4.

Salmonella, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* não foram detectadas em nenhuma das amostras ao longo de todo o tempo de 28 dias de estocagem anaeróbica a 1°C. No entanto, o trabalho de Nissen et al (2000) reforça a importância do controle da temperatura para garantir a segurança microbiológica da carne fresca embalada em AM em condições anaeróbicas. Esses autores compararam o crescimento de várias bactérias patogênicas inoculadas em carne moída acondicionada em três diferentes sistemas de embalagem e observaram que a 10°C algumas cepas de *Salmonella* apresentaram um crescimento relativamente superior a 0,4%CO/60%CO₂/39,6%N₂ quando comparada com a estocagem aeróbica (70%O₂/30%CO₂ ou ar).

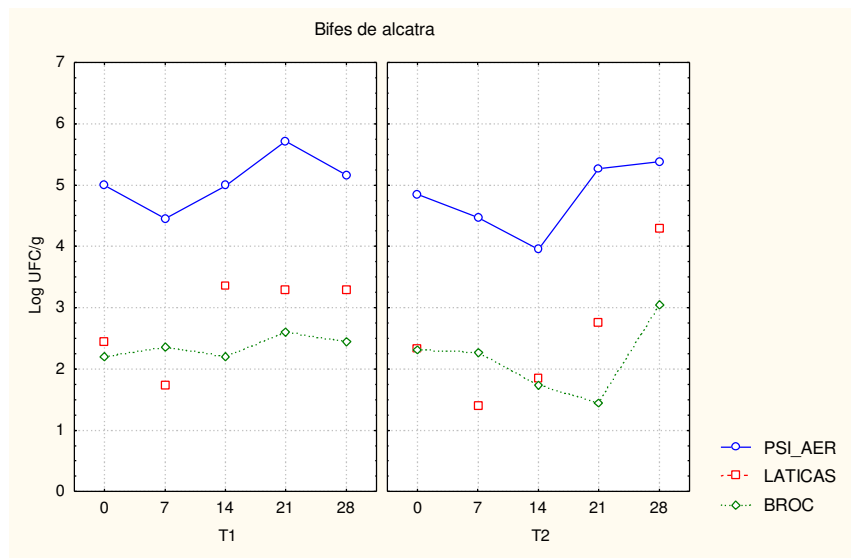


Figura 1 – Valores médios para a contagem de microrganismos (log UFC/g) presentes nos bifes de alcatra estocados em T₁: 39,8 %N₂ / 60%CO₂ / 0,2%CO e T₂: 99,80%CO₂ / 0,2%CO.

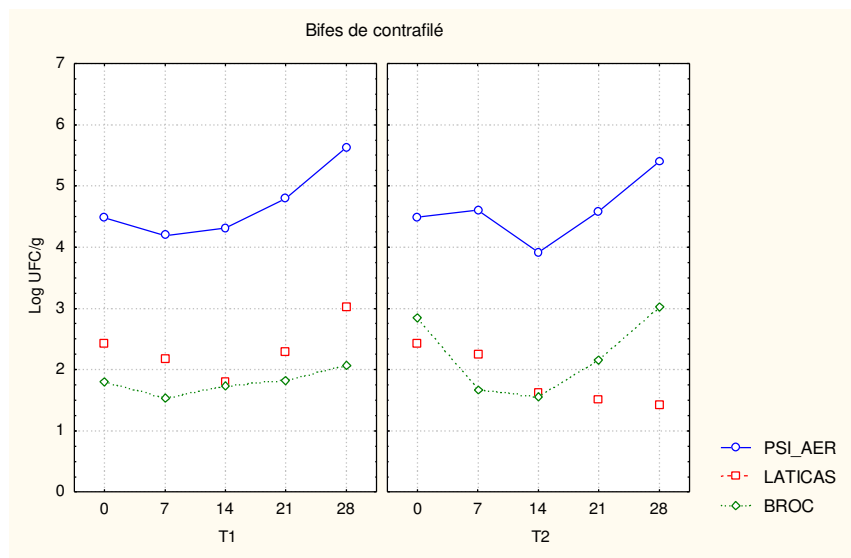


Figura 2 - Valores médios para a contagem de microrganismos (log UFC/g) presentes nos bifes de contrafilé estocados em T₁: 39,8 %N₂ / 60%CO₂ / 0,2%CO e T₂: 99,80%CO₂ / 0,2%CO.

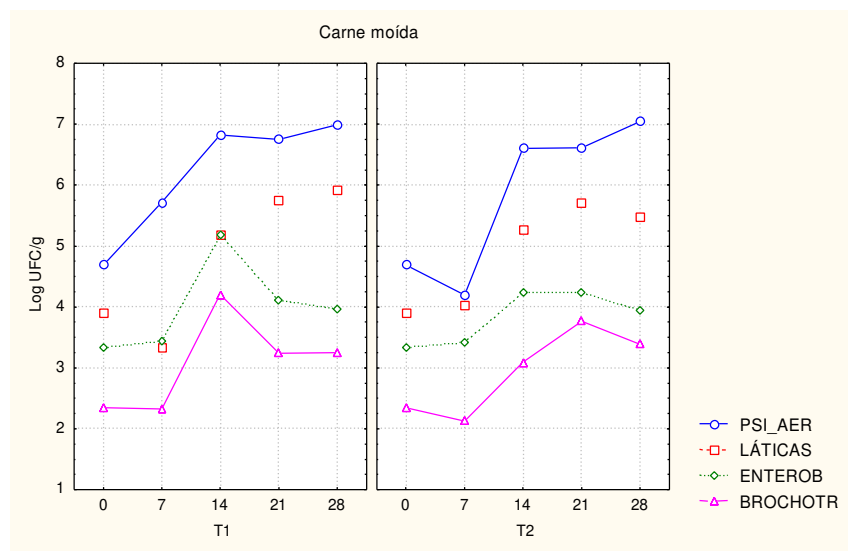


Figura 3 - Valores médios para a contagem de microrganismos (log UFC/g) presentes na carne moída estocados em T₁: 39,8 %N₂ / 60%CO₂ / 0,2%CO e T₂: 99,80%CO₂ / 0,2%CO.

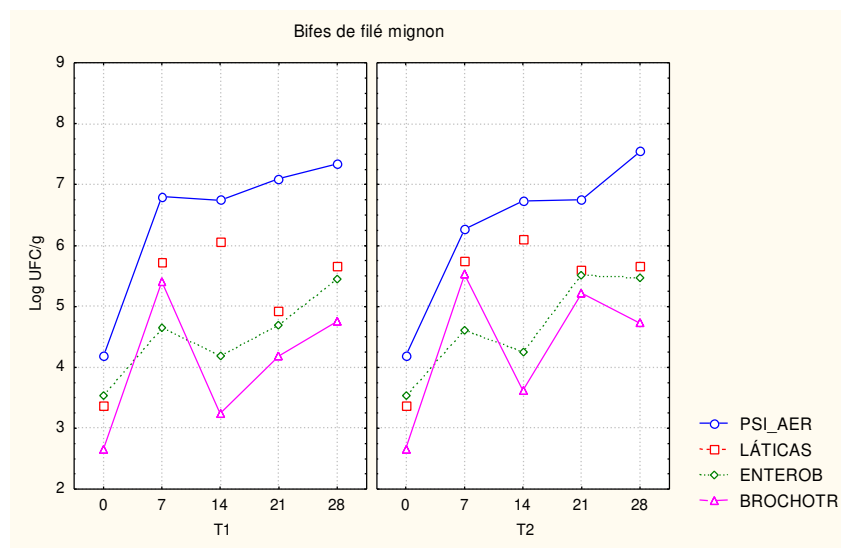


Figura 4 - Valores médios para a contagem de microrganismos (log UFC/g) presentes nos bifes de filé mignon estocados em T₁: 39,8 %N₂ / 60%CO₂ / 0,2%CO e T₂: 99,80%CO₂ / 0,2%CO.

3.4 - Análise sensorial

3.4.1 - Interação músculo x tratamento

Na Tabela 2 pode-se observar que a cor visual inicial dos bifes de alcatra e contrafilé foi relativamente superior a dos bifes de filé mignon e carne moída que apresentaram menor intensidade de cor vermelha (C^*).

Tabela 2 - Médias para cor instrumental e sensorial (interação músculo x tratamento) dos produtos acondicionados em atmosfera modificada por 28 dias a 1°C.

Variáveis	Tratamento ¹	Produtos								EP ²
		alcatra		contrafilé		carne moída		filé mignon		
L*	inicial	41,85	aw	38,72	aw	47,55	bw	40,87	aw	0,25-0,21
	T1	38,18	ax	39,63	aw	43,11	bx	40,49	abw	
	T2	38,54	awx	40,68	acw	45,00	bwx	41,75	cw	
Chroma ³	inicial	17,89	aw	21,14	aw	16,25	aw	17,55	aw	0,21-0,24
	T1	25,10	ax	25,28	ax	20,63	bx	17,55	cw	
	T2	21,19	aw	23,77	awx	18,96	bwx	16,43	bw	
hue ⁴	inicial	35,23	aw	34,72	aw	38,37	aw	38,20	aw	0,13-0,56
	T1	36,79	aw	36,44	aw	32,30	aw	31,14	aw	
	T2	40,30	aw	37,15	aw	32,81	aw	34,69	aw	
cor visual ⁵	inicial	9,00	aw	8,67	aw	7,59	bw	6,85	bw	0,04-0,08
	T1	8,50	aw	8,67	aw	6,60	bx	5,93	cx	
	T2	6,02	ax	7,30	bx	6,67	cx	5,60	dx	
Mancha marron ⁶	inicial	4,94	aw	4,94	aw	4,81	aw	4,81	aw	0,02-0,02
	T1	4,95	aw	4,88	aw	4,23	bx	3,86	cx	
	T2	4,31	ax	4,57	ax	4,16	ax	3,42	by	
Aparência global ⁷	inicial	4,50	aw	4,50	aw	4,19	aw	4,25	aw	0,04-0,03
	T1	4,44	aw	4,10	aw	3,58	cx	2,92	dx	
	T2	3,20	ax	3,18	ax	3,53	bx	2,58	cy	
Odor desagradável ⁸	inicial	4,94	aw	4,94	aw	4,94	aw	5,00	aw	0,01-0,09
	T1	4,19	ax	4,67	bw	4,22	ax	3,68	cx	
	T2	3,85	ax	4,45	bw	4,09	abx	3,61	ax	

¹T₁ = 0.2% CO + 60%CO₂ + 39.8%N₂; T₂ = 0.2% CO + 99.8%CO₂; ² Erro padrão; ³ Chroma = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$; ⁴ Hue angle = $(b^*/a^*)\text{tg}^{-1}$; ⁵ Cor visual = 0cm = marrom acinzentado; 4,5cm = vermelha amarronzada; 9cm = vermelha típico de carne fresca; ⁶ Mancha marrom (%) = 5 = nenhuma (0%); 4 = leve (1-10%); 3 = pequena (11-20%); 2 = moderada (21-60%); 1 = intensa (61-100%); ⁷ Aparência global = 5 = muito agradável; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável; ⁸ Odor desagradável: 5 = nenhum odor/aroma normal; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável.

a-d Médias na mesma linha com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

w-z Médias na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

A razão da reflectância entre 630 nm e 580 nm (630/580 nm) foi relativamente menor nas amostras de filé mignon, indicando que estas amostras apresentavam maior oxidação dos pigmentos que as demais amostras desde o início da estocagem.

Em geral, a cor visual e a aparência das amostras em 0,2%CO+60%CO₂ foi superior ($p<0,05$) ao das amostras em 0,2%CO+99,8%CO₂, provavelmente devido a maior porcentagem de descoloração observadas nestas amostras. O aumento da concentração de CO₂ de 60 para 99,8% foi mais prejudicial para a cor e a aparência global dos bifes de alcatra e contrafilé do que para os bifes de filé mignon ou carne moída. Estas diferenças, embora estatisticamente significativas, tiveram pouca importância prática porque, em ambos os tratamentos, todos produtos apresentavam cor predominantemente vermelha (nota > 4,5), aparência aceitável (notas >3) e cor instrumental (L*,C*,h*) similar ao da carne fresca.

Os bifes de alcatra e contrafilé estocados em 0,2%CO+60%CO₂ apresentaram cor homogênea em toda sua superfície (cerca de 0% de descoloração) e aparência global similar à da carne fresca, enquanto que as amostras estocadas em 0,2%CO+99,8%CO₂ apresentaram pequenas frações de metamioglobina (1-10%) que, no entanto, não foram suficientes para tornar a aparência desagradável (notas<3).

A embalagem em 0,2%CO+60%CO₂ aumentou as notas sensoriais de cor dos bifes de alcatra e da carne moída ($p<0,05$), enquanto que a cor visual dos bifes de contrafilé se manteve similar ao da carne fresca. O pronunciado aumento da intensidade de cor vermelha (C*) influenciou positivamente a aparência dos bifes de alcatra que nesta atmosfera foi geralmente superior ($p<0,05$) à da carne fresca. Esses resultados concordam com os dados encontrados por Hunt et al (2004) que sugerem que a aplicação de CO seja mais benéfica para cortes com menor estabilidade de cor, como o alcatra, do que para cortes com alta estabilidade como o contrafilé.

Já a cor visual e a aparência dos bifes de filé mignon foram inferiores ao da carne fresca em ambos os tratamentos, embora os valores de luminosidade (L*), intensidade de

vermelho (C*) e intensidade de marrom (h*) não tenham apresentado qualquer alteração significativa com relação aos valores medidos na matéria-prima. As maiores porcentagens de descoloração encontradas nos bifes de filé mignon (11-20%) influenciaram negativamente a avaliação da aparência global, principalmente das amostras estocadas em 0,2%CO+99,8%CO₂. Portanto, a adição de 0,2% CO não foi suficiente para eliminar os problemas de reoxigenação (re-blomming) tipicamente associados com músculos mais susceptíveis à oxidação como *psoas major*.

Muito provavelmente, a instabilidade da cor vermelha do filé mignon foi afetada pela concentração residual de oxigênio, que foi sempre maior que o limite considerado crítico para a descoloração durante a estocagem em AM. Gill & McGinnis (1995) mostraram que a carne bovina com baixa estabilidade da cor como o filé mignon se oxida mesmo quando em baixas concentrações de oxigênio residual (<0,1%).

Resultados melhores foram obtidos por Hunt et al (2004) utilizando uma atmosfera contendo 0,4%CO/30%CO₂/69,6%N₂ em conjunção com absorvedores de oxigênio de maior capacidade do que os usados neste experimento. Maiores níveis de CO associados à completa exclusão de oxigênio residual desde o início do experimento, eliminaram os problemas de reoxigenação em *psoas major*, *semimembranosus* e em carne moída que geralmente apresentam maior dificuldade em restaurar a cor vermelha típica de carne fresca, após estocagem anaeróbica contendo concentrações extremamente baixas de oxigênio.

A mistura gasosa não afetou a avaliação do aroma da carne estocada em AM que foi considerado normal ou ligeiramente agradável em todos os produtos de todos os tratamentos (notas > 3), apesar das notas terem sido estatisticamente inferiores ao da carne fresca ($p < 0,05$).

3.4.2 - Interação corte x tempo de estocagem em AM

A aparência global dos bifes de alcatra, contrafilé e carne moída foi similar à da carne fresca até o 14º dia de estocagem em AM, independente da concentração de CO₂ (Tabela 3). Nos períodos subsequentes, a aparência foi inferior à da carne fresca ($p < 0,05$), mas não o suficiente para tornar o produto desagradável. A diminuição da aparência foi resultado do início da formação de metamioglobina na superfície da carne (1-10%). Segundo Renner & Mazuel (1985) o consumidor rejeita a carne fresca, antes mesmo que sua segurança seja comprometida, quando cerca de 20% de metamioglobina recobre a sua superfície.

Os bifes de filé mignon apresentaram um ciclo de descoloração transitória entre o 7º e 21º dia de estocagem em AM, quando as amostras apresentaram as maiores frações de descoloração (11-20%) (Tabela 3). Essas manchas mais escuras na superfície da carne afetaram negativamente a avaliação visual da cor e a aparência dessas amostras. Tal descoloração se resolveu somente após 28 dias de estocagem, quando a cor visual atingiu valores similares ao da carne fresca e a aparência tornou-se mais agradável.

Tabela 3 - Médias para cor instrumental e sensorial (interação músculo x tempo de estocagem) dos produtos acondicionados em atmosfera modificada por 28 dias a 1°C.

Vardável	Estocagem		Produtos				EP1
	(dias)	alcatra	contraadlé	carne moída	adlé mdbnon		
L*	0	41,85 aw	38,72 aw	47,55 bw	40,87 aw		0,24
	7	37,04 ax	38,15 aw	43,37 bx	39,31 ax		
	14	37,97 ax	40,72 awx	44,31 bwx	38,97 ax		
	21	38,40 ax	38,67 aw	43,11 bx	39,76 abx		
	28	40,03 awx	43,08 abx	45,42 bw	46,44 bx		
Croma2	0	17,89 abw	21,14 ax	16,25 bx	17,55 abwx		0,28
	7	20,60 awx	23,05 awx	19,16 awx	13,60 bx		
	14	22,37 ax	24,30 awx	22,61 aw	17,13 bwx		
	21	23,06 axy	23,96 awx	20,20 abwx	18,65 bw		
	28	26,56 ay	26,80 aw	17,21 bx	18,58 bw		
cue3	0	35,23 aw	34,72 aw	38,37 a	38,20 awx		0,56
	7	40,31 aw	37,83 abw	28,82 bx	29,93 bxy		
	14	39,34 aw	38,00 aw	35,66 awx	37,96 ax		
	21	39,82 aw	36,09 aw	41,22 aw	42,77 aw		
	28	34,71 aw	35,26 aw	24,53 bx	21,01 by		
Cor vdsual6	0	9,00 aw	8,67 abw	7,59 bw	6,85 bw		0,05
	7	7,54 abx	8,40 aw	6,93 bw	5,34 cx		
	14	7,36 abx	8,08 aw	7,01 bw	5,39 cx		
	21	6,41 ay	7,72 bw	6,00 acx	5,27 cx		
	28	7,72 ax	7,74 aw	6,60 bwx	7,06 abw		
Mancca marrom7	0	4,94 aw	4,94 aw	4,81 aw	4,81 aw		0,03
	7	4,85 aw	4,80 awx	4,45 awx	3,69 bxy		
	14	4,91 aw	4,93 aw	4,48 awx	3,31 by		
	21	4,23 ax	4,74 bwx	3,77 acy	3,49 cy		
	28	4,53 awx	4,43 abx	4,08 abxy	4,06 bx		
Aparêncda8	0	4,50 aw	4,50 aw	4,19 aw	4,25 aw		0,03
	7	4,20 awy	4,04 aw	3,82 aw	2,60 bx		
	14	3,97 awy	3,92 awy	3,75 aw	2,40 bx		
	21	3,27 ax	3,20 ab	3,03 aby	2,69 bx		
	28	3,84 ay	3,42 aby	3,63 abw	3,32 by		
Odor ⁹	0	4,94 aw	4,94 aw	4,94 aw	5,00 aw		0,03
	7	4,30 awx	4,77 aw	4,79 aw	4,03 ay		
	14	4,11 abx	4,52 aw	4,49 aw	3,86 ayz		
	21	3,92 ax	4,63 bw	3,41 ay	2,72 cx		
	28	3,75 abx	4,33 aw	3,67 aby	3,65 by		

¹ Erro padrão; ² Chroma = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$; ³ Hue angle = $(b^{*}/a^{*})\text{tg}^{-1}$

⁴ Cor visual = 0cm = marrom acinzentado; 4,5cm = vermelha amarronzada; 9cm = vermelha típico de carne fresca;

⁵ Mancha marrom (%) = 5 = nenhuma (0%); 4 = leve (1-10%); 3 = pequena (11-20%); 2 = moderada (21-60%); 1 = intensa (61-100%);

⁶ Aparência global = 5 = muito agradável; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável;

⁷ Odor desagradável: 5 = nenhum odor/aroma normal; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável.

a-d Médias na mesma linha com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

w-z Médias na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

A descoloração transitória observada nos bifes de filé mignon entre o 7º e o 21º dia de estocagem poderia ter sido evitada se a capacidade de redução da metamioglobina da carne tivesse sido preservada durante a estocagem em AM. Hunt et al (2004) conseguiram evitar a descoloração de bifes de contrafilé, coxão mole, filé mignon e carne moída por 35 dias em 0,4%CO/30%CO₂/69,6%N₂ seguidos de aproximadamente três dias de exposição atmosférica, utilizando absorvedores do mesmo tipo (pré-ativado) que os usado neste experimento e com uma capacidade menor de seqüestro. Gill e McGinnis (1995), Tewari et al (2002) observaram que os absorvedores de oxigênio de rápida ação de diferentes marcas comerciais apresentam uma significativa variação na taxa de absorção de oxigênio.

Resultados obtidos em experimento preliminar (Capítulo 3) mostraram que o uso de absorvedores de oxigênio é dispensável na estocagem com 0,2% CO de cortes mais estáveis à oxidação, como no caso dos bifes de alcatra e contrafilé. Por outro lado, em cortes com menor capacidade de redução da metamioglobina como na carne moída e nos bifes de filé mignon, os absorvedores de oxigênio não são apenas indispensáveis como também exigem uma capacidade de absorção maior do que a estimada neste experimento. Tewari et al (2001) recomendam colocar o absorvedor de oxigênio na própria bandeja para reduzir o número de absorvedores requeridos.

Odor desagradável somente foi evidente nos bifes de filé mignon que receberam notas inferiores a 3 (considerado o limite da aceitabilidade pela equipe sensorial), a partir do 21º dia de estocagem em AM, coincidindo com a obtenção de altas contagens de bactérias psicrotróficas aeróbias e *B. thermosphacta* que atingiram valores próximos do limite para a detecção de odores desagradáveis. *Pseudomonas* provavelmente contribuíram para a alteração organoléptica dos bifes de mignon. O odor desagradável foi detectado de 4 a 7 dias mais cedo em carne estocada a 8°C do que a 4°C (Sørheim et al, 1999). Conseqüentemente, a vida útil da carne estocada em AM está fortemente associada à manutenção de baixas temperaturas na cadeia do frio.

3.4.3 - Interação corte x tempo de exposição ao oxigênio atmosférico

As notas para cor sensorial da carne moída e dos bifes de filé mignon diminuíram significativamente ($p < 0,05$) após a retirada das bandejas dos sacos de distribuição para simulação das condições de varejo, independente da concentração de CO_2 na atmosfera. Após 48 h de exposição ao ar, a cor visual dessas amostras variou de vermelho a marrom, ocorrendo misturas de oximioglobina, carboximioglobina e metamioglobina (Tabela 4). Embora a deoximioglobina tenha alta afinidade pelo CO, a mudança de cor ocorreu em condições atmosféricas devido à perda do CO ligante, reoxigenação, e subsequente oxidação do ferro.

Nas amostras de filé mignon esta alteração de cor foi mais acelerada do que na carne moída, o que tornou a aparência do produto inaceitável (notas < 3) após 24 h de exposição aeróbica. Na carne moída o aumento da metamioglobina (porcentagem de descoloração), a diminuição da cor vermelha instrumental e sensorial e aparência global inaceitável foram mais evidentes ($p < 0,05$) somente após 48 h de exposição aeróbica.

Hunt et al (2004) sugeriram que a oximioglobina formada a partir da carboximioglobina exposta ao oxigênio atmosférico é mais sensível à oxidação do que a oximioglobina formada na carne exposta somente ao ar atmosférico através das embalagens convencionais.

Esses resultados demonstram que a cor da carne acondicionada em embalagens de distribuição contendo CO, e posteriormente exposta ao oxigênio atmosférico, se deteriora numa taxa similar ou menor àquela observada em bandejas convencionais. O que não ocorre necessariamente quando o CO é aplicado diretamente nas embalagens primárias. Este foi o ponto chave para a aprovação do uso de CO na embalagem secundária da carne pelo FDA em 2002 (FDA, 2002).

Odor desagradável somente foi perceptível nos bifes de filé mignon após 48 h de exposição aeróbica, provavelmente, devido ao aumento do número de psicrotóxicos aeróbicos, favorecidos pela exposição ao ar.

Tabela 4 - Médias para cor instrumental e sensorial (músculo x tempo de exposição ao oxigênio atmosférico) dos produtos acondicionados em atmosfera modificada por 28 dias a 1°C.

Vardável	Exposdção aeróbdca (c)	Produtos				EP ¹
		alcatra	contraadlé	carne moída	adlé mdbnon	
L *	1	39,58 aw	40,17 aw	46,01 bw	41,95 aw	0,24
	24	39,38 aw	39,98 aw	44,61 bw	41,23 aw	
	48	38,21 aw	39,45 aw	43,63 bw	40,03 aw	
C* ²	1	20,64 abw	21,89 aw	19,08 abw	17,32 bw	0,28
	24	22,43 aw	24,45 aw	19,75 abw	17,48 bw	
	48	23,21 aw	25,21 aw	18,42 bw	16,51 bw	
c* ³	1	37,16 aw	35,87 aw	27,15 bw	26,21 bw	0,56
	24	37,76 aw	36,26 aw	32,84 aw	33,72 aw	
	48	38,72 aw	37,02 aw	41,17 ax	42,00 ax	
cor vdsual ⁴	1	7,39 aw	8,02 aw	7,12 ab	6,46 b	0,05
	24	7,46 awb	8,05 aw	7,15 b	6,17 c	
	48	7,50 aw	8,12 ax	5,95 b	5,02 b	
Mancca marrom ⁵	1	4,73 aw	4,78 aw	4,53 aw	4,54 aw	0,03
	24	4,66 aw	4,83 aw	4,61 aw	3,88 bx	
	48	4,60 aw	4,63 aw	3,65 bx	2,88 cy	
Aparêncda blobal ⁶	1	3,92 aw	3,89 aw	3,91 aw	3,56 aw	0,03
	24	3,88 aw	3,69 aw	4,06 aw	2,97 bx	
	48	3,89 aw	3,63 aw	2,92 bx	2,23 cy	
odor ⁷	1	4,10 aw	4,63 bw	4,48 bcw	4,27 cw	0,03
	24	4,94 ax	4,94 aw	4,81 aw	4,79 ax	
	48	4,14 aw	4,58 bw	3,57 cx	2,57 dy	

¹ Erro padrão.

² Chroma = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$

³ Hue angle = $(b^*/a^*)\text{tg}^{-1}$

⁴ Cor visual = 0cm = marrom acinzentado; 4,5cm = vermelha amarronzada; 9cm = vermelha típico de carne fresca.

⁵ Mancha marrom (%) = 5 = nenhuma (0%); 4 = leve (1-10%); 3 = pequena (11-20%); 2 = moderada (21-60%); 1 = intensa (61-100%).

⁶ Aparência global = 5 = muito agradável; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável.

⁷ Odor desagradável: 5 = nenhum odor/aroma normal; 4 = ligeiramente agradável; 3 = pouco agradável; 2 = moderadamente desagradável e 1 = extremamente desagradável.

a-d Médias na mesma linha com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

w-z Médias na mesma coluna com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

Já os bifes de alcatra e contrafilé mantiveram cor vermelha atrativa e homogênea (praticamente nenhuma descoloração), e odor agradável durante todo o período de 48 h de exposição aeróbica.

3.5 - Análise instrumental

Em geral, os valores de cor instrumental confirmaram as mudanças de cor visual devido ao tratamento, tempo de estocagem em AM e tempo de exposição ao ar. No sistema CIEL*a*b*, a principal mudança de cor observada na carne embalada com 0,2% CO foi o aumento do valor de C* (maiores valores indicam maior intensidade de vermelho) que foi significativamente superior ou similar ao da carne fresca em todos os produtos avaliados (Tabela 2). De acordo com McDougall (1994), na formação da metamioglobina (marrom), o índice de saturação da cor (C*) diminui à medida que a cor muda de vermelho brilhante (C*=20) para vermelho escuro (C*=18), marrom (C*=14) ou marrom acinzentado (C*=12), enquanto que o aumento do ângulo hue (h*) indica maior intensidade de marrom.

Após 28 dias de estocagem o significativo ($p<0,05$) aumento da saturação da cor vermelha (C*) foi acompanhado de concomitante redução de h* nas amostras de carne moída e nos bifes de filé mignon, indicando um aumento na intensidade de vermelho e diminuição na intensidade de marrom em relação ao observado na carne fresca, independente do tratamento. Na avaliação inicial da carne fresca ($t = 0$ dia), somente os bifes de contrafilé apresentaram índices de saturação considerados típicos de carne fresca, ou seja, maiores que 20 (Tabela 3). Os bifes de alcatra e de filé mignon e a carne moída apresentaram saturação da cor menor que 18, antes da embalagem em AM, característico da carne com cor vermelha levemente amarronzada, segundo os critérios de McDougall citados acima.

O aumento da saturação da cor ao longo da estocagem foi mais pronunciado nos cortes que tiveram maior estabilidade da cor, como o alcatra e o contrafilé, que aumentaram continuamente os valores de C*, atingindo valores máximos em torno de 26, após 28 dias em AM, independente do tratamento (Tabela 3). A carne moída apresentou saturação da cor

similar ou superior ao da carne fresca, atingindo valores máximos de cerca de 22 após 14 dias de estocagem. A maior variação de C^* foi observada nos bifes de filé mignon que atingiram valores mínimos em torno de 13 após 7 dias de estocagem e valores similares ao da carne fresca nos períodos subsequentes (Tabela 3). Este escurecimento transitório pode ocorrer nos cortes que apresentam menor estabilidade à oxidação da cor, nos primeiros dias de estocagem em AM contendo concentrações residuais de oxigênio $>100\text{ppm}$ (Gill & Jones, 1994a e 1994b, Gill & McGinnis, 1995). Tewari et al (2001) observaram dois ciclos de descoloração transitória nos bifes de filé mignon embalados em sacos de distribuição com CO_2 , após 4 e 7 dias de estocagem, devido à presença de oxigênio residual. Hunt et al (2004) também observaram um leve escurecimento da cor da carne bovina estocada em $0,4\% \text{CO}/30\% \text{CO}_2/69,5\% \text{N}_2$ após 7 dias de estocagem a 2°C , mas não suficiente para descaracterizar a cor vermelha brilhante típica de carne fresca.

Infelizmente os absorvedores de oxigênio empregados neste experimento não foram eficientes para eliminar todo o oxigênio residual nas primeiras horas após a selagem como recomendado por Gill (1996), apesar de terem sido superdimensionados. É que a taxa de ‘seqüestro’ pelos absorvedores de oxigênio comerciais declina exponencialmente com a diminuição da concentração de oxigênio para valores abaixo de 1% (Gill & McGinnis, 1995). Concentrações residuais menores poderiam ter sido obtidas utilizando-se bandejas plásticas co-extrusadas ao invés da bandeja convencional de poliestireno expandido (Tewari, Jeremiah, Jayas & Holley, 2002). No entanto, buscou-se, aplicar esta nova tecnologia a um sistema de embalagem já largamente utilizado e familiar aos consumidores e varejistas, de baixo custo e disponível no mercado brasileiro pelos fabricantes de embalagens, o que não ocorre com as bandejas co-extrusadas, que certamente seriam as mais adequadas para a embalagem da carne em atmosfera livre de oxigênio.

O aumento da estabilidade da cor da carne moída e dos bifes de filé mignon após 28 dias de estocagem em $0,2\% \text{CO}$ também pôde ser monitorado pelo formato das curvas de reflectância (Figura 5).

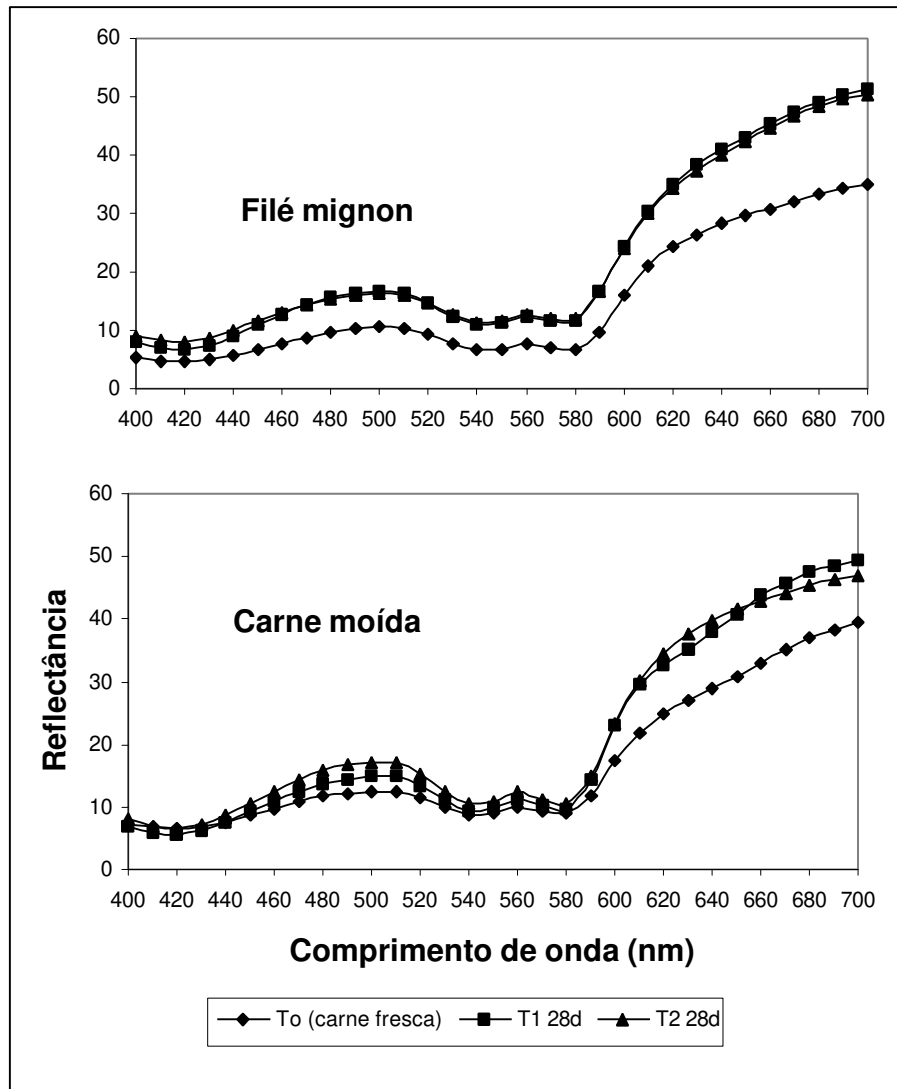


Figura 5 – Curvas de reflectância dos bifes de filé mignon e da carne moída expostos somente ao ar (To) ou estocados por 28 dias a 1°C em 0,2%CO/60% CO₂ (T₁) ou 0,2%CO /99,8% CO₂ (T₂).

A diminuição da intensidade de cor marrom (h^*) e o aumento da intensidade de cor vermelha (C^*) após estocagem em 0,2%CO por 28 dias foi acompanhada pelo aumento na porcentagem de reflectância a 630 nm (região do vermelho).

Nos bifes de alcatra e de contrafilé, onde a variação de h^* não foi significativa, as curvas de reflectância foram similares ao longo de todo o tempo de 28 d de estocagem (dados não apresentados).

Esses resultados permitem concluir que 0,2% CO foi suficiente para estabilizar a cor tanto de cortes com maior estabilidade à oxidação tais como o contrafilé e o alcatra, como também aumentar a intensidade da cor de produtos mais sensíveis à descoloração, como a carne moída e o filé mignon. Todavia, trabalhos anteriores conseguiram aumentar e estabilizar a cor da carne bovina utilizando misturas gasosas contendo concentrações de 0,4-0,5 %CO.

Luño et al (2000) examinaram vários níveis de CO em misturas gasosas contendo 24%O₂ e 50% CO₂ e concluíram que a estabilização da cor e do aroma de *Longissimus lumborum* acondicionados em embalagens primárias requer um mínimo de 0,5% CO, embora frações menores de metamioglobina tenham sido obtidas utilizando 0,75%CO. Em trabalho anterior, Sørheim et al (1999) conseguiram estabilizar a cor e o aroma da carne moída e de *L. lumborum* utilizando misturas livres de oxigênio contendo 0,4%CO e 60% CO₂. Hunt et al (2004) e Seyfert et al (2007) obtiveram resultados semelhantes utilizando 0,4%CO e 30% CO₂ em embalagens de distribuição.

A estabilidade alcançada neste trabalho, utilizando concentração de CO relativamente menor (0,2%) do que a dos trabalhos citados pode ser resultado da maior estabilidade da cor dos bovinos oriundos de cruzamento industrial. Um estudo realizado para predizer a maciez da carne através da cor concluiu que a cor da carne bovina oriunda das raças taurinas apresentava maiores valores de luminosidade (L^*) e menores valores de vermelho (a^*) ($p < 0,05$) comparados com os valores obtidos de animais cruzados com zebuínos (Wulf et al, 1997).

O efeito do tempo de exposição aeróbica sobre a cor instrumental confirmou os resultados obtidos na avaliação sensorial. O reconhecimento da cor marrom avermelhada na superfície da carne moída e dos bifes de filé mignon pela equipe de provadores, após 48h de exposição ao oxigênio atmosférico, foi acompanhado pelo aumento de h^* ($p < 0,05$) e com o início da redução de C^* (Tabela 4). A diminuição na reflectância entre 630 e 580 nm, revela que essa mudança da cor vermelha para marrom, típica da formação de metamioglobina, ocorreu após 28 dias de estocagem e somente após 48h de exposição aeróbica (Figura 6).

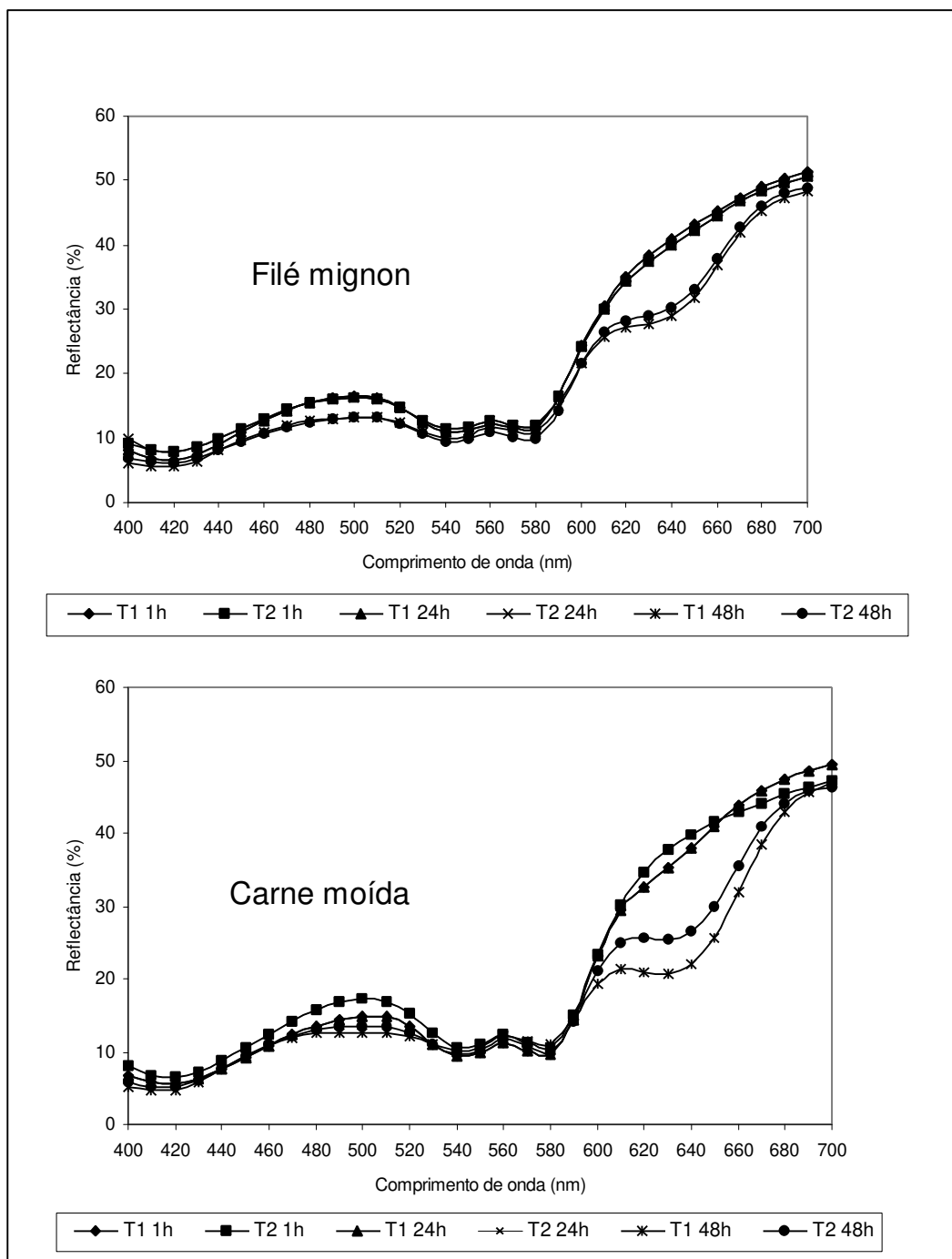


Figura 6 - Curvas de reflectância da carne moída e dos bifes de filé mignon expostos por 1, 24 e 48 h ao oxigênio atmosférico, após 28 dias de estocagem em 0,2%CO/60% CO₂ (T₁) ou 0,2%CO /99,8% CO₂ (T₂) a 1°C.

3.6 - Oxidação lipídica

Neste experimento os valores de TBARS não excederam 0,3 mg de malonaldeído / kg em nenhum dos produtos avaliados. Luño et al (2000) obtiveram valores pouco maiores durante a estocagem em 0,25%-1% CO associado a 24% de oxigênio e 50%CO₂. Esses autores observaram valores máximos de TBARS em torno de 0,7 mg de malonaldeído / kg após 29 dias de estocagem em 0,25%, que diminuíram significativamente com o aumento da concentração de CO até 1%. Com relação à oxidação lipídica, Greene & Cumuze (1981) concluíram que TBARS de pelo menos 2,0 mg de malonaldeído/ kg são necessárias para que haja percepção de odor de ranço.

Estes dados permitem predizer que a alteração organoléptica observada nos bifes de filé mignon está mais relacionada com o desenvolvimento das bactérias psicrótróficas, estritas ou facultativas, do que com processos oxidativos.

4 - CONCLUSÃO

A embalagem da carne fresca em sacos de distribuição contendo 0,2% CO e pelo menos 40% CO₂ pode ser uma alternativa para estabilizar a cor e manter a qualidade microbiológica da carne bovina por até 28 dias a 1°C, mesmo em concentração residual de oxigênio considerada excessiva para sistemas de embalagem anaeróbica (>0,1). Após 28 dias de estocagem em AM e 24h de exposição aeróbica, os bifes de alcatra, contrafilé, filé mignon e a carne moída apresentaram aparência aceitável e cor visual similar ou superior à da carne fresca. Além disso, nenhum desses produtos apresentaram contagens superiores a 7,5 log UFC/g, considerado o limite crítico para a deterioração microbiológica. No entanto, após 24h de exposição aeróbica, tanto a aparência como o odor dos bifes de filé mignon e da carne moída foram julgados 'ligeiramente desagradável'. Assim, a adição de 0,2% de CO nas condições deste experimento não foi suficiente para mascarar a qualidade microbiológica.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION (AMSA). **Guidelines for meat color evaluation**. In: 44th ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE American Meat Science Association, 1991, Manhattan. **Proceedings...** Manhattan: National Live Stock and Meat Board.

BELCHER, J.N. Industrial packaging developments for the global meat market. **Meat Science**, v.74, p.143-148, 2006.

GILL, CO. The solubility of carbon dioxide in meat. **Meat Science**, v.22, p.65-71, 1988.

GILL, C.O. Extending the storage life of raw chilled meats. **Meat Science**, v.43, p.99-109, 1996.

GILL, C.O.; MCGINNIS, J.C. The effects of residual oxygen concentration and temperature on the degradation of the colour of beef packaged under oxygen-depleted atmospheres. **Meat Science**, v.39, p.387-394, 1995.

GREENE, B.E.; CUMUZE, T.H. Relationship between TBA-numbers and inexperienced panelists assessments of oxidized flavor in cooked beef. **Journal of Food Science**, 47, 52-58, 1981.

HUNT, M.C.; MANCINI, R.A.; HACHMEISTER, D.H.; KROPF, D.H.; MERRIMAN, M.; DELDUCA, G.; MILIKEN, G. Carbon monoxide in modified atmosphere packaging affects color, shelf life, and microorganisms of beef steaks and ground beef. **Journal of Food Science**, v.69, n.1, p.45-52, 2004.

JAKOBSEN, M. & BERTELSEN, G. Predicting the amount of carbon dioxide absorbed in meat. **Meat Science**, v. 68, n. 4, p. 603-610, 2004.

LEDWARD, D.A. Metmyoglobin formation in beef muscles as influenced by content and anatomical location. **Journal of Food Science**, Chicago, v.36, p.138-140, 1971.

LUÑO, M.; RONCALÉS, P.; DJENANE, D.; BELTRÁN, J.A. Beef shelf-life in low O₂ and high CO₂ atmospheres containing different low CO concentrations. **Meat Science**, v.55, p.413-419, 2000.

MEILGAARD M.; CIVILLE G. V. & CARR, B. T. (1987). **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press.

NISSEN, H.; ALVSEIKE, O.; BREDHOLT, S.; HOLCK, A.; NESBAKKEN, T. Comparison between the growth of *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.211-220, 2000.

O'KEEFFE & HOOD, D.E. Anoxic storage of fresh beef: colour stability and weigh loss. **Meat Science**, v.5, p.267-281, 1980-81a.

O'KEEFFE; HOOD, D.E. Anoxic storage of fresh beef: nitrogen and carbon dioxide storage atmospheres. **Meat Science**, v.5, p.27-39, 1980-81b.

O'KEEFFE M.; HOOD, D.E. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef from muscles of different colour stability. **Meat Science**, 7, 209-221, 1982.

RENERRE, M. & MAZUEL, J.P. (1985). Relations entre méthodes de mesures instrumentales et sensorielles de la couleur de la viande. **Sciences des Aliments**, v. 4, p. 567-584, 1985.

RENERRE, M. Review: Factors involved in the discoloration of beef meat. **International Journal of Food Science and Technology** v.25, p.613-630, 1990.

ROUSSET, S. & RENERRE, M. (1991). Effect of CO₂ or vacuum packaging on normal and high pH meat shelf-life. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 26, n. 6, p. 641-652, 1991.

SEYFERT, M; MANCINI, MA; HUNT, MC; TANG, J & FAUSTMAN, C. Influence of carbon monoxide in package atmospheres containing oxygen on colour, reducing activity, and oxygen consumption of five bovine muscles. **Meat Science**, v.75, p. 432-442, 2007.

SØRHEIM, O.; NISSEN, H.; NESBAKKEN, T. The storage life of beef and pork packaged in an atmosphere with low carbon monoxide and high carbon dioxide **Meat Science** v.52 p.157-164, 1999.

SØRENSEN, G.; JØRGENSEN, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 202, p. 205-210, 1996.

ULU, H. Evaluation of three 2- thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. (2004). **Meat Science**, v. 67, p. 683-687, 2004.

VIANA, E.S.; GOMIDE, L.A.M.; VANETTI, M.C.D. Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. **Meat Science**, v. 71, p. 696-705, 2005.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette, Seifen, Anstrichm.** v. 72, p. 1084-1087, 1970

VYNCKE, W. Evaluation of direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Fette, Seifen, Anstrichm.**, v. 77, p. 239-240, 1975.

WULF D.M.; O'CONNOR, S. F.; TATUM J.D.; SMITH G. C. Using Objective Measures of Muscle Color to Predict Beef Longissimus Tenderness. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 684–692, 1997.

ANEXOS



Figura 1 – Bifes de alcatra estocados sob $T_1 = 0.2\% \text{ CO} + 60\% \text{ CO}_2 + 39.8\% \text{ N}_2$ por 28 dias a 1°C .



Figura 2 – Bifes de contrafilé estocados sob $T_1 = 0.2\% \text{ CO} + 60\% \text{ CO}_2 + 39.8\% \text{ N}_2$ por 28 dias a 1°C .



Figura 3 – Bifes de filé mignon estocados sob $T_1 = 0.2\% \text{ CO} + 60\% \text{ CO}_2 + 39.8\% \text{ N}_2$ por 28 dias a 1°C .



Figura 4 – Carne moída de paleta estocada sob $T_1 = 0.2\% \text{ CO} + 60\% \text{ CO}_2 + 39.8\% \text{ N}_2$ por 28 dias a 1°C .



Figura 5 - Bifes de alcatra estocados sob $T_2 = 0.2\% \text{ CO} + 99.8\% \text{ CO}_2$ por 28 dias a 1°C .



Figura 6 - Bifes de contrafilé estocados sob $T_2 = 0.2\% \text{ CO} + 99.8\% \text{ CO}_2$ por 28 dias a 1°C .



Figura 7 - Bifes de filé mignon estocados sob $T_2 = 0.2\% \text{ CO} + 99.8\% \text{ CO}_2$ por 28 dias a 1°C .



Figura 8 - Carne moída de paleta sob $T_2 = 0.2\% \text{ CO} + 99.8\% \text{ CO}_2$ por 28 dias a 1°C .

CONCLUSÃO GERAL

A manutenção da cor vermelha da carne bovina embalada em 0,2% CO foi melhor alcançada utilizando atmosferas livres de oxigênio.

As misturas livres de oxigênio contendo a 0,2%CO produziram uma estabilidade satisfatória à cor, comparável ou superior ao da carne fresca, o que é uma clara vantagem do ponto de vista toxicológico. O aumento da concentração de CO de 0,2 para 0,4% aumentou significativamente a saturação da cor da carne, que foi considerada muito ‘artificial’ por alguns provadores.

A presença de cerca de 0,6% de oxigênio residual nas embalagens primárias, imediatamente após a selagem das bandejas, não afetou a avaliação sensorial e instrumental da cor e da aparência global dos produtos estocados sob 0,2% CO. A aplicação de 0,2 % CO nas embalagens primárias minimizou os efeitos da concentração residual de oxigênio sobre a cor dos bifes de alcatra e contrafilé, que mantiveram aparência e aroma similares ou superiores ao da carne fresca durante os 21 dias de estocagem em AM, independente do uso de absorvedores de oxigênio. No entanto, o uso de 0,2% CO não eliminou a necessidade de uso de absorvedores de oxigênio nos sistemas de embalagem de distribuição, onde a concentração residual de oxigênio foi relativamente superior à alcançada nas embalagens primárias devido à utilização de bandejas plásticas convencionais de poliestireno expandido.

A embalagem da carne em 39,8% N₂ / 60% CO₂ / 0,2% CO mostrou ser a melhor técnica para a manutenção da estabilidade da cor de bifes de alcatra, contrafilé, file mignon e carne moída por 28 dias a 1°C. Melhores resultados poderiam ter sido obtidos utilizando-se absorvedores de oxigênio com maior taxa de absorção ou bandejas plásticas co-extrudadas ao invés da bandeja convencional de poliestireno expandido.

De acordo com os resultados obtidos nestes experimentos, verificou-se que a manutenção de 40% CO₂ ao longo de todo o período de estocagem a 1°C possibilita garantir a qualidade e a segurança microbiológica ao consumidor.

A estabilização da cor utilizando 0,2% CO associado a altas concentrações de CO₂ não apresentou risco microbiológico, mas fatores tais como permeabilidade, temperatura e a relação entre volume de gás e quantidade de carne são cruciais para obtenção do máximo efeito antimicrobiano.

LISTA DE ARTIGOS

Venturini, A.C., Faria, J.A.F. & Contreras, C.J.C. (2007) Uso de Monóxido de Carbono em Embalagem de Carne Fresca. Será submetido ao *Brazilian Journal of Food Science*. Parte da revisão foi publicada na Revista Nacional da Carne, 2006.

Venturini, A.C., Faria, J.A.F., Contreras, C.J.C. & Gallo, C.R. (2007) Microbiological, Color and Sensory Properties of Fresh Beef Steaks Under Low Carbon Monoxide with or without Oxygen. Submitted to *Journal of Food Science* in January 2007.

Venturini, A.C., Faria, J.A.F. & Contreras, C.J.C. (2007) Diferentes Sistemas de Embalagem Anaeróbica para Embalagem da Carne Fresca. Será submetido à Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Parte do artigo já aceito no ICoMST 2007.

Venturini, A.C., Faria, J.A.F. & Contreras, C.J.C. (2007) Embalagem de Carne Fresca em Embalagens de Distribuição em Atmosfera Anaeróbica Contendo 0,2% de Monóxido de Carbono (CO) e Altas Concentrações de Dióxido de Carbono (CO₂). Será submetido à Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos.