

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**“Influência da Formulação e Condições de Aquecimento
na Injúria e Destruição de *Listeria monocytogenes*
em Hambúrguer”**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maria Helena Castro Reis Passos, aprovada pela Comissão Julgadora em 30 de março de 2000.

Maria Helena Castro Reis Passos
Engenheira de Alimentos

Campinas, 30 de março de 2000.

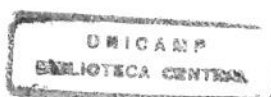

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Presidente da Banca

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

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

Campinas, SP
Março, 2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



0148-0000

UNIDADE	OC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	P268i
V.	Ex.
TOMBO BC/	41471
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	11-07-00
N.º CPD	

CM-00142428-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P268i Passos, Maria Helena Castro Reis
Influência da formulação e condições de aquecimento na
injúria e destruição de *Listeria monocytogenes* em hambúrguer /
Maria Helena Castro Reis Passos. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

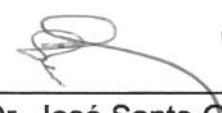
Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Hambúrguer.
3. Microrganismos – Efeito do calor sobre. I. Kuaye, Arnaldo
Yoshiteru. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

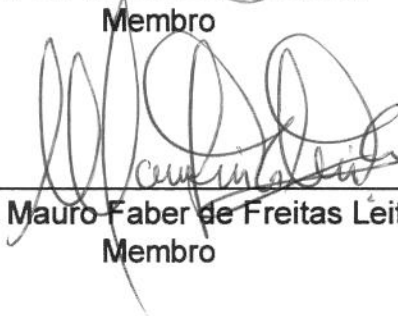
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Orientador

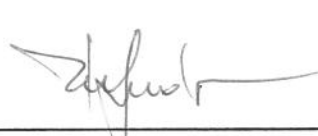


Prof. Dr. José Santo Goldoni
Membro



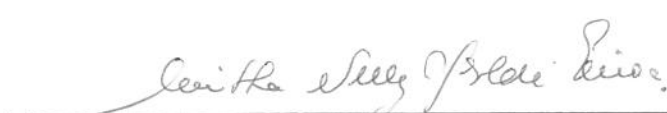
Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
Membro

Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício
Membro



Profa. Dra. Raquel Monteiro Cordeiro de Azeredo
Membro

Profa. Dra. Maria Cristina Dantas Vanetti
Membro



Profa. Dra. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa
Membro

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Para Ana Carolina e Beatriz,
com muito amor.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Arnaldo, orientador e amigo, pela disponibilidade e confiança, e pelo conhecimento transmitido em todos esses anos de convivência;
- Ao meu marido, Carlinhos, por ter compartilhado todos os momentos, e ter “sobrevivido” a mais essa fase da nossa vida;
- À minha mãe, Biisa, pelo apoio incondicional, especialmente nas horas mais difíceis;
- À Dirce, pela amizade e incentivo, pelo auxílio e sugestões “que fizeram diferença”. À Raquel e D. Jacinta, pela amizade e colaboração no laboratório;
- À Isabela, pela amizade e carinho, e pelo auxílio interessado e responsável no desenvolvimento da parte experimental;
- Aos amigos do Laboratório de Higiene - Angela, Patrícia, Pedro, Daniel, Valéria, Ana Lucia, Alaíse, Carla, Ana Paola e Graziela, pela convivência saudável e espírito cooperativo, que possibilitaram conduzir o trabalho de forma mais “suave”. À Cida, amiga “não-higiênica”, pelas sugestões;
- À FAPESP, pelo apoio financeiro ao projeto;
- Ao Dr. Ernesto Hofer, da Fundação Oswaldo Cruz, pela sorotipagem das cepas de *Listeria monocytogenes*;
- Ao Prof. Lincoln, pelas sugestões e empréstimo dos termômetros-padrão. Ao Flávio (de Aracaju), pelo auxílio na confecção dos termopares;
- Ao Flávio Schmidt, pelas sugestões concedidas nos experimentos de determinação da resistência térmica;
- Aos amigos - Cidinha e Flávio, Márcia e Adriano, Giselda e Breno, Gersoni e Alexandre, pelo apoio e incentivo;
- À banca examinadora, pelas correções e sugestões apresentadas;
- À todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	x
GENERAL SUMMARY	xiii
INTRODUÇÃO	1
 CAPÍTULO 1	
Revisão Bibliográfica	
1. HAMBÚRGUER BOVINO	4
1.1 Qualidade Higiênico-Sanitária	6
1.1.1 Hambúrguer Produzido Industrialmente	7
1.1.2 Hambúrguer Produzido Artesanalmente	10
1.1.3 Hambúrguer Pronto para o Consumo	11
1.2 Surto de Enfermidade Alimentar Associados ao Consumo de Hambúrguer	12
1.3 Tratamento Térmico Utilizado no Preparo do Hambúrguer	14
1.3.1 Letalidade Recomendada para o Tratamento	14
1.3.2 Fatores Determinantes da Eficiência do Tratamento	15
1.3.3 Indicadores da Eficiência do Tratamento	18
1.3.4 Transferência de Calor em Hambúrguer	24
2. <i>Listeria monocytogenes</i> EM CARNE BOVINA	25
2.1 Caracterização e Classificação Taxonômica	25
2.2 Listeriose de Origem Alimentar	25
2.3 Fontes de Contaminação	27
2.4 Sobrevivência e Multiplicação em Carne e Hambúrguer	30
2.5 Incidência, Sorotipos e Nível de Contaminação em Carne Moída	32
2.6 Efeito do Congelamento e Incidência em Hambúrguer	35

2.7 Resistência Térmica	38
2.7.1 Propriedades do Meio de Aquecimento	40
2.7.2 Cepas Utilizadas	46
2.7.3 Temperatura e Fase de Crescimento	48
2.7.4 Choque Térmico e Velocidade de Aquecimento	49
2.7.5 Outras Condições de Estresse	52
2.8 Injúria Subletal Promovida pelo Calor	53
2.9 Letalidade Recomendada para <i>L. monocytogenes</i> em Produtos Cárneos	59
3. Referências Bibliográficas	62

CAPÍTULO 2

Resistência Térmica de *Listeria monocytogenes* em Formulações para Hambúrguer: Influência do Meio de Cultura Empregado para Contagem da População Sobrevivente

RESUMO	88
SUMMARY	90
1. INTRODUÇÃO	91
2. MATERIAL E MÉTODOS	92
2.1 Preparo dos Ingredientes	92
2.1.1 Carne	92
2.1.2 Proteína Texturizada de Soja (PTS)	93
2.2 Preparo das Formulações para Hambúrguer	93
2.3 Avaliação Físico-Química e Microbiológica dos Ingredientes e das Formulações	93
2.3.1 Análises Físico-Químicas	93
2.3.2 Análises Microbiológicas	94
2.4 Determinação do Tempo “Lag” de Aquecimento	95

2.5 Preparo do Inóculo	95
2.6 Inoculação e Acondicionamento das Formulações nos Tubos TDT	96
2.7 Tratamento Térmico e Contagem de <i>L. monocytogenes</i>	97
2.8 Determinação dos Valores <i>D</i> e <i>z</i>	98
2.9 Análise Estatística	99
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.1 Avaliação Microbiológica dos Ingredientes	99
3.2 Avaliação Físico-Química e Microbiológica das Formulações	100
3.3 Determinação dos Valores <i>D</i> e <i>z</i>	100
4. CONCLUSÕES	105
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

CAPÍTULO 3

Influência do Teor de Gordura, Cloreto de Sódio e Proteína Texturizada de Soja na Resistência Térmica de *Listeria monocytogenes* em Formulações para Hambúrguer

RESUMO	111
SUMMARY	112
1. INTRODUÇÃO	113
2. MATERIAL E MÉTODOS	114
2.1 Preparo dos Ingredientes	114
2.1.1 Carne	114
2.1.2 Proteína Texturizada de Soja (PTS)	115
2.2 Preparo das Formulações para Hambúrguer	115
2.3 Avaliação Físico-Química e Microbiológica dos Ingredientes e das Formulações	116
2.3.1 Análises Físico-Químicas	116

2.3.2 Análises Microbiológicas	116
2.4 Determinação do Tempo “Lag” de Aquecimento	117
2.5 Preparo do Inóculo	118
2.6 Inoculação e Acondicionamento das Formulações nos Tubos TDT	119
2.7 Tratamento Térmico e Contagem de <i>L. monocytogenes</i>	119
2.8 Determinação dos Valores <i>D</i> e <i>z</i>	120
2.9 Análise Estatística	121
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	122
3.1 Avaliação Microbiológica dos Ingredientes	122
3.2 Avaliação Físico-Química e Microbiológica das Formulações	122
3.3 Determinação dos Valores <i>D</i>	123
3.3.1 Influência do Teor de Gordura	125
3.3.2 Influência do Teor de Cloreto de Sódio	128
3.3.3 Influência do Teor de Proteína Texturizada de Soja	129
3.4 Determinação dos Valores <i>z</i>	130
4. CONCLUSÕES	131
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

CAPÍTULO 4

Avaliação da Influência dos Ingredientes, Tempo de Fritura e Temperatura Final dos Hambúrgueres na Injúria e Destruição de *Listeria monocytogenes*

RESUMO	138
SUMMARY	140
1. INTRODUÇÃO	142
2. MATERIAL E MÉTODOS	144
2.1 Preparo dos Ingredientes	144

2.1.1 Carne	144
2.1.2 Proteína Texturizada de Soja (PTS)	145
2.2 Preparo das Formulações para Hambúrguer	145
2.3 Avaliação Físico-Química e Microbiológica dos Ingredientes e das Formulações	146
2.3.1 Análises Físico-Químicas	146
2.3.2 Análises Microbiológicas	146
2.4 Preparo do Inóculo	147
2.5 Inoculação das Formulações e Preparo dos Hambúrgueres	148
2.6 Fritura dos Hambúrgueres	148
2.7 Contagem de <i>L. monocytogenes</i> nos Hambúrgueres	149
2.8 Análise Estatística	150
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	151
3.1 Avaliação Microbiológica dos Ingredientes	151
3.1.1 Carne	151
3.1.2 Proteína Texturizada de Soja	152
3.2 Avaliação Físico-Química e Microbiológica das Formulações	152
3.2.1 Análises Físico-Químicas	152
3.2.2 Análises Microbiológicas	153
3.3 Avaliação do Processo de Fritura dos Hambúrgueres	154
3.3.1 Influência dos Ingredientes	158
3.3.2 Influência do Tempo de Fritura	160
3.3.3 Influência da Temperatura Final dos Hambúrgueres	163
4. CONCLUSÕES	165
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
CONCLUSÕES GERAIS	177
ANEXOS	180

RESUMO GERAL

Neste trabalho foi avaliada a influência do meio de cultura empregado na contagem da população sobrevivente de *Listeria monocytogenes*, e do teor de gordura, cloreto de sódio e proteína texturizada de soja na resistência térmica do microrganismo, inoculado em formulações para hambúrguer bovino. Investigou-se, também, a influência dos ingredientes, tempo de fritura e temperatura final dos hambúrgueres na injúria e destruição da bactéria, reproduzindo-se o preparo comercial do produto. Partindo-se de carne submetida a tratamento para redução da microbiota contaminante, foram preparadas quatro formulações de hambúrguer: 10% de gordura (F1), 20% de gordura (F2), 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio (F3) e 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada (F4), inoculadas com uma suspensão contendo uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes*. A determinação da resistência térmica foi realizada utilizando-se tubos "TDT" fechados com tampa de borracha, em banho de água à temperatura de 55,0, 60,0 e 65,0°C. Para a contagem da população sobrevivente, empregou-se ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (TPAP) e ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM), e, para confirmação da colônia, a técnica de iluminação a 45°. Nos experimentos de fritura, os hambúrgueres (113 g) congelados foram aquecidos em chapa elétrica a $185 \pm 5^\circ\text{C}$. Oito hambúrgueres de cada formulação foram submetidos a fritura durante 2, 4, 6, 8 e 10 min, procedendo-se a viragem dos mesmos na metade do tempo total. Quatro hambúrgueres foram imediatamente resfriados após a fritura, enquanto outros quatro foram mantidos fora de chapa (à temperatura ambiente) durante 1 min, simulando assim o tempo de espera dos estabelecimentos comerciais. A contagem de *L. monocytogenes* foi efetuada empregando-se TPAP e ágar triptose fosfato adicionado de 4% de cloreto de sódio (TPAS), com confirmação da colônia através da técnica de iluminação a 45°.

Nos experimentos para determinação da resistência térmica, partindo-se da contagem em TPAP, os valores *D* obtidos por regressão linear para F1, F2, F3 e F4 a 55,0°C foram 36,11, 39,93, 62,76 e 37,97 min, respectivamente. A 60,0°C os valores *D* foram 2,86, 2,55, 4,32 e 3,24 min, enquanto que a 65,0°C valores iguais a 0,34, 0,34, 0,52 e 0,36 min foram obtidos. Os valores *D* calculados a partir da contagem em LPM para F1, F2, F3 e F4 a 55,0°C foram 23,05, 23,46, 38,54 e 23,93 min, respectivamente. A 60,0°C os valores *D* foram 2,09, 1,81, 3,06 e 2,02 min, e a 65,0°C obtiveram-se valores iguais a 0,27, 0,25, 0,37 e 0,29 min. Os valores *z* encontrados foram 4,93, 4,83, 4,81 e 4,95°C com TPAP e 5,18, 5,08, 4,95 e 5,21°C com LPM, para F1, F2, F3 e F4, respectivamente. Nos experimentos de fritura, as contagens obtidas em TPAP e TPAS demonstraram que o processo não provoca injúria na população sobrevivente. Observou-se também que o efeito da fritura sobre a população de *L. monocytogenes* passou a ser mais intenso somente a partir de 6 min de processo. A fritura por 6 min, seguida de imediato resfriamento, promoveu redução da contagem da ordem de 2,01, 2,72, 1,92 e 2,25 ciclos logarítmicos para F1, F2, F3 e F4, respectivamente. Após 8 min, a população foi reduzida em 3,78, 3,73, 3,03 e 3,79 ciclos logarítmicos, enquanto que após 10 min de fritura a redução obtida foi de 5,28, 4,46, 3,77 e 5,95 ciclos logarítmicos. O processo com tempo adicional de espera de 1 min promoveu uma redução na contagem da ordem de 2,80, 3,08, 2,85 e 2,85 ciclos logarítmicos para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, após 6 min de fritura. Após 8 min, a redução foi de 4,45, 4,04, 3,61 e 4,51, enquanto que após 10 min a população foi reduzida em 6,77, 5,38, 4,21 e 6,48 ciclos logarítmicos.

Os resultados obtidos demonstraram que a resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer é subestimada até 1,6-1,7 vezes quando o meio LPM é utilizado para contagem da população sobrevivente, e que o emprego de cloreto de sódio na formulação, à concentração de 1,5%, promove aumento na resistência térmica da bactéria. Os resultados mostraram,

também, que a presença de NaCl, à concentração de 1,5%, e o tempo de espera após a fritura, exercem influência na letalidade do processo para *L. monocytogenes*, em hambúrguer.

GENERAL SUMMARY

This research evaluated the influence of the culture medium used on the enumeration of the surviving population, and of the fat, sodium chloride and texturized soy protein contents on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in formulations for beef hamburger. The influence of the ingredients, frying time and final temperature of the hamburgers on the injury and destruction of the bacteria was also investigated, reproducing the commercial preparation of the product. Using meat submitted to treatment to reduce the background microflora, four hamburger formulations were prepared: 10% fat (F1), 20% fat (F2), 10% fat and 1.5% sodium chloride (F3) and 10% fat and 10.5% hydrated texturized soy protein (F4), and each was inoculated with a suspension containing a mixture of 5 strains of *L. monocytogenes*. Thermal resistance was determined in rubber capped TDT tubes submerged in water baths at 55.0, 60.0 and 65.0°C. For the surviving population count, tryptose phosphate agar containing 1% sodium pyruvate (TPAP) and lithium chloride phenylethanol moxalactam (LPM) agar were used, the technique of illumination at 45° being used to confirm the colonies. For the frying experiments, the frozen hamburgers (113g) were heated on a electric griddle at $185 \pm 5^\circ\text{C}$. For each formulation, eight hamburgers were fried for 2, 4, 6, 8 and 10 minutes, each being turned over after half the time had elapsed. After frying, four hamburgers were immediately cooled, whilst the other four were held at room temperature for 1 min, thus simulating the lag occurring in commercial establishments. The *L. monocytogenes* count was effected using TPAP and tryptose phosphate agar with 4% added sodium chloride (TPAS), with colony confirmation using the technique of illumination at 45°.

In the experiments to determine thermal resistance, proceeding from the TPAP count, the *D*-values obtained by linear regression for F1, F2, F3 and F4 at 55.0°C were respectively 36.11, 39.93, 62.76 and 37.97 min. At 60.0°C, the *D*-

values were 2.86, 2.55, 4.32 and 3.24 min, whilst at 65.0°C the values obtained were 0.34, 0.34, 0.52 and 0.36 min. The *D*-values for enumeration on LPM for F1, F2, F3 and F4 at 55.0°C were 23.05, 23.46, 38.54 and 23.93 min, respectively. At 60.0°C the values obtained were 2.09, 1.81, 3.06 and 2.02 min, and at 65.0°C they were 0.27, 0.25, 0.37 and 0.29 min. The *z* values obtained were 4.93, 4.83, 4.81 and 4.95°C with TPAP and 5.18, 5.08, 4.95 and 5.21°C with LPM for F1, F2, F3 and F4 respectively. In the frying experiments, the counts obtained on TPAP and TPAS showed that the process provoked no injury to the surviving population. It was also observed that the effect of frying on the population of *L. monocytogenes* became more intense at processing times of 6 min or more. Frying for 6 min, followed by immediate cooling, resulted in a reduction of the count to the order of 2.01, 2.72, 1.92 and 2.25 logarithmic cycles for F1, F2, F3 and F4, respectively. After 8 min frying, the population was reduced by 3.78, 3.73, 3.03 and 3.79 logarithmic cycles, whereas after 10 min frying, these values were 5.28, 4.46, 3.77 and 5.95. The process with a 1 min lag resulted in a count reduction to the order of 2.80, 3.08, 2.85 and 2.85 logarithmic cycles for F1, F2, F3 and F4 respectively after 6 min frying. After 8 min the reduction was 4.45, 4.04, 3.61 and 4.51, whereas after 10 min the population was reduced by 6.77, 5.38, 4.21 and 6.48 logarithmic cycles.

The results showed that the thermal resistance of *L. monocytogenes* in formulations for hamburger is underestimated by a factor of 1.6-1.7 times when LPM medium is used for the surviving population count, and that the use of sodium chloride in the formulation at a concentration of 1.5% increases the thermal resistance of the bacteria. The results also showed that the presence of 1.5% NaCl and a time lag after frying had an influence on the lethality of the process for *L. monocytogenes* in hamburgers.

INTRODUÇÃO

As atribuições da vida moderna têm provocado mudanças nos hábitos alimentares da população, observando-se um aumento progressivo do consumo de refeições rápidas preparadas fora do âmbito doméstico, inclusive de sanduíches preparados com hambúrguer.

O hambúrguer, por se tratar de um produto que sofre várias manobras tecnológicas no seu preparo, sendo intensamente manipulado na produção artesanal, geralmente está exposto a maiores e mais freqüentes oportunidades de contaminação por bactérias patogênicas.

O tratamento térmico é um processo amplamente empregado e uma das formas mais efetivas para destruição de microrganismos patogênicos presentes em alimentos. Entretanto, a ocorrência de surtos envolvendo hambúrguer mal cozido contaminado com *Escherichia coli* O157:H7 despertou a atenção dos órgãos de saúde pública dos Estados Unidos quanto à efetividade do tratamento térmico utilizado, resultando na alteração das condições de temperatura e tempo recomendadas para o preparo do produto para consumo.

No Brasil, existem diversos tipos de estabelecimentos que preparam e comercializam sanduíches com hambúrguer, muitas vezes sem um controle efetivo do processo de fritura da carne.

Na década de 80, *Listeria monocytogenes* despontou como um importante microrganismo patogênico, responsável por enfermidade de origem alimentar. Sua ampla disseminação na natureza, a associação desta bactéria com doença animal e sua natureza psicrófila despertaram o interesse da indústria e dos órgãos de saúde pública sobre o possível papel da carne e produtos cárneos na veiculação da listeriose. Embora os principais surtos relatados na literatura tenham sido provocados por produtos vegetais e lácteos, mais recentemente

produtos cárneos foram também envolvidos, ou epidemiologicamente implicados, em alguns surtos e casos esporádicos de listeriose.

Dentre as medidas de controle de *L. monocytogenes* em alimentos, destaca-se o uso adequado do calor. Entretanto, essa bactéria parece ser mais resistente à destruição e injúria térmica do que muitos outros microrganismos patogênicos não formadores de esporos responsáveis por enfermidades alimentares, inclusive quando submetida a aquecimento em carne. Além disso, há indicações de que alguns componentes do alimento podem proteger a célula bacteriana do efeito do calor.

Devido à gravidade da doença em indivíduos susceptíveis e à alta taxa de mortalidade observada nos surtos relatados, a realização de estudos visando obter informações sobre a resistência térmica de *L. monocytogenes* em alimentos é de fundamental importância para o estabelecimento de processos térmicos seguros.

Frente ao exposto, e considerando-se a possível aplicação dos resultados a outros tipos de produtos cárneos, este trabalho objetivou:

- * avaliar a influência do meio de cultura empregado para contagem da população sobrevivente na determinação da resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em formulações para hambúrguer.
- * avaliar a influência do teor de gordura, cloreto de sódio e proteína texturizada de soja na resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em formulações para hambúrguer.
- * avaliar a influência dos ingredientes, tempo de fritura e temperatura final dos hambúrgueres na injúria e destruição de *Listeria monocytogenes*.

O presente trabalho consta de quatro capítulos, sendo que o **Capítulo 1**, referente à revisão bibliográfica, seguiu as normas para redação de tese da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, e destinou-se a dar embasamento teórico aos estudos desenvolvidos, apresentados nos capítulos 2, 3 e 4 na forma de artigos.

Os artigos foram redigidos conforme as normas da revista Ciência e Tecnologia de Alimentos da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA), os quais são descritos a seguir:

Capítulo 2

Resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em formulações para hambúrguer: influência do meio de cultura empregado para contagem da população sobrevivente.

Capítulo 3

Influência do teor de gordura, cloreto de sódio e proteína texturizada de soja na resistência térmica de *Listeria monocytogenes* em formulações para hambúrguer.

Capítulo 4

Avaliação da influência dos ingredientes, tempo de fritura e temperatura final dos hambúrgueres na injúria e destruição de *Listeria monocytogenes*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. HAMBÚRGUER BOVINO

O hambúrguer bovino consiste, basicamente, em uma mistura moldada de carne e gordura moídas, adicionada ou não de sal e condimentos. Com finalidade tecnológica e/ou econômica, derivados protéicos de soja também podem ser utilizados como ingredientes. No processamento de hambúrguer são empregados cortes magros e aparas com alto teor de gordura, resfriados ou congelados, e, após mistura, trituração e moldagem, o produto é armazenado sob refrigeração ou, mais freqüentemente, submetido ao congelamento (Surkiewicz et al., 1975; Cross et al., 1975; Goepfert, 1977; Anônimo, 1997).

O teor de gordura do hambúrguer é um fator de grande importância para a maciez, suculência e intensidade de sabor e aroma do produto. Segundo Cross et al. (1980), os consumidores parecem ter preferência por hambúrgueres contendo um teor de gordura igual ou superior a 15%. Em testes sensoriais realizados com consumidores, Huffman & Egbert (citados por Egbert et al., 1991) obtiveram uma aceitação global máxima para o produto com aproximadamente 20% de gordura, quando testados teores variando de 5 a 25%. Resultados similares foram também obtidos por Berry & Leddy (citados por Egbert et al., 1991).

Nas últimas décadas, a preocupação dos consumidores com a dieta e a saúde tem determinado uma mudança dos padrões de consumo de alimentos, observando-se uma tendência para a redução do consumo de gordura e um consequente aumento da demanda por produtos de origem animal com baixo teor de gordura (Egbert et al., 1991; Troutt et al., 1992a).

Segundo Giese (1992), devido ao alto consumo de hambúrguer, muitas pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de produtos cárneos com baixo teor de gordura têm se concentrado na formulação deste produto, o que levou o "United States Department of Agriculture" (USDA) a estabelecer que a adição de qualquer ingrediente à carne, a fim de obter hambúrguer com baixo teor de gordura, deve constar no rótulo do produto. Além disso, a combinação da gordura e do ingrediente adicionado não deve exceder 30%, permitindo-se um teor máximo de 10% de gordura.

Vários estudos foram realizados visando reduzir o teor de gordura do hambúrguer bovino de 20 para 10% ou menos através da adição de novos ingredientes e utilização de manobras tecnológicas. Entretanto, uma depreciação das características sensoriais foi observada nos produtos com teores reduzidos (Berry, 1994).

Vários substitutos de gordura têm sido utilizados na formulação de hambúrgueres, incluindo derivados protéicos de soja, carragena, farelo de aveia, amidos modificados e maltodextrinas (Keeton, 1994).

As vantagens atribuídas aos derivados protéicos de soja são a facilidade de uso e a familiaridade como ingrediente, uma vez que são utilizados há anos em produtos cárneos, além de fornecer proteína de alto valor biológico (Giese, 1992). Segundo Keeton (1994), vários estudos realizados demonstraram que, aumentando-se a quantidade de proteína de soja no hambúrguer, reduz-se a perda de peso e de umidade devida ao cozimento, o teor de colesterol, a incidência de sabor rançoso residual e a força de cisalhamento; entretanto, a intensidade do sabor e aroma de carne também é reduzida.

A legislação brasileira, através da Portaria nº 115/78, permite o emprego de proteína texturizada de soja em hambúrguer até 7,5% em base seca ou 22,5% em base hidratada; entretanto, sempre que a adição exceder a 3,5% em base

seca ou 10,5% em base hidratada, será obrigatório declarar, no rótulo, o percentual empregado (Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária - SNDA, 1978).

1.1 Qualidade Higiênico-Sanitária

Nenhuma etapa do processamento de hambúrguer permite eliminar ou reduzir a contaminação por microrganismos patogênicos ou deterioradores (Duitschaeffer et al., 1973; Anônimo, 1997). Assim, a qualidade higiênico-sanitária do produto final é determinada principalmente pela contaminação superficial dos cortes e aparas de carne utilizados (Burzynska et al., 1971; Surkiewicz et al., 1975; Gill et al., 1996; Anônimo, 1997; Gill et al., 1997). Entretanto, a contaminação proveniente de outros ingredientes, do ambiente, equipamentos e manipuladores, assim como as condições de tempo e temperatura empregadas durante o processamento, armazenamento e exposição para venda, também podem contribuir para o aumento de microrganismos no produto (Duitschaeffer et al., 1973; Surkiewicz et al., 1975; Anônimo, 1997; Gill et al., 1997).

O congelamento, processo frequentemente empregado na produção de hambúrguer, é um método de preservação que promove o controle da atividade microbiana, podendo ter um efeito letal para muitas bactérias presentes no alimento. Entretanto, a intensidade deste efeito depende de uma série de fatores, tais como: tipo de microrganismo, composição do alimento e condições de processo a que o alimento é submetido antes, durante e após o congelamento. Assim, alimentos congelados podem conter tanto células bacterianas mortas quanto viáveis, muitas das quais podem estar em condição de injúria. Bactérias patogênicas e indicadoras podem sobreviver em quantidades variáveis por um longo período de tempo (Speck & Ray, 1977).

Gill et al. (1997) compararam a qualidade higiênico-sanitária de hambúrgueres antes e após o congelamento em três indústrias do Canadá e observaram uma redução da contagem total a 25°C entre <0,1 e 0,5 ciclo logarítmico, devida ao processo de congelamento.

Analisando hambúrgueres antes do congelamento, Geer et al. (citados por Surkiewicz et al., 1975) verificaram que treze das vinte amostras apresentavam contagem total em placa que excedia 10^7 UFC/g. Apesar de o congelamento e a manutenção congelada terem promovido uma redução da contaminação, os autores observaram que dez amostras mantidas a -18°C durante um mês apresentavam contagem superior a 1×10^6 UFC/g.

1.1.1 Hambúrguer Produzido Industrialmente

Trabalhos conduzidos em diferentes países têm evidenciado elevados índices de contaminação e presença de bactérias patogênicas em hambúrgueres produzidos industrialmente.

Análises de amostras de hambúrguer congelado, coletadas no final de linhas de produção, em indústrias dos Estados Unidos, evidenciaram uma elevada contaminação e presença de bactérias patogênicas. Surkiewicz et al. (1975) analisaram 735 amostras coletadas em 42 indústrias e verificaram que 24% apresentavam contagem total de microrganismos mesófilos acima de 1×10^6 UFC/g. Respectivamente, 8 e 15% do total de amostras continham *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* acima de 1×10^2 NMP/g e *Salmonella* sp. foi isolada em 0,4% das amostras. No estudo realizado por Goepfert (1977), de um total de 604 amostras analisadas, 33,1% apresentavam contagem total em placa (20-22°C) superior a 1×10^6 UFC/g e 44,8% estavam contaminadas por *E. coli* a um nível superior a 1×10^2 NMP/g.

No Canadá, Gill et al. (1997) avaliaram a qualidade microbiológica de hambúrguer em três indústrias, após o congelamento, e constataram variações de 4,14 a 4,74, 0,87 a 1,55 e 0,62 a 1,46 ciclos logarítmicos, para contagem total a 25°C, de coliformes totais e de *E. coli*, respectivamente. Os valores obtidos em hambúrguer resfriado, recém-produzido, foram ligeiramente superiores.

Na Polônia, Burzinska et al. (1971) observaram que aproximadamente 70% dos hambúrgueres coletados no final da linha de produção apresentavam qualidade microbiológica inadequada.

A análise de hambúrgueres coletados no varejo tem demonstrado, igualmente, a qualidade higiênico-sanitária insatisfatória do produto.

Pivnick et al. (1976) verificaram que 19,4% das amostras de hambúrguer congelado, coletadas em estabelecimentos varejistas do Canadá, apresentavam contagem de microrganismos mesófilos acima de 1×10^6 UFC/g. Quando a contagem foi feita utilizando incubação das placas a 21°C, 69,5% das amostras excederam este limite. Duitschaeffer et al. (1977) constataram contagem total a 21°C acima de 1×10^6 UFC/g em 69,7% das amostras, *E. coli* acima de 1×10^2 NMP/g em 13,1%, e presença de *S. aureus* em níveis superiores a 1×10^3 UFC/g em 83,8% das amostras de hambúrguer congelado. Os hambúrgueres mantidos sob refrigeração apresentaram um nível de contaminação mais elevado.

Nesse mesmo país, Gill et al. (1997) observaram que o $\log_{10}$ das contagens obtidas na análise de hambúrguer congelado variou de 3,81 a 5,44, de 1,13 a 2,00 e de 0,71 a 1,87 para contagem total a 25°C, coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. Os hambúrgueres refrigerados, por sua vez, apresentaram valores substancialmente superiores, o que foi atribuído ao armazenamento prolongado ou a condição de abuso de temperatura. O trabalho realizado por Kotula et al. (1977) demonstrou que a manutenção de hambúrguer a 4°C por até

12 dias aumentava significativamente a população de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrófilos e coliformes totais.

Na Holanda, Tamminga et al. (1982) verificaram que a contagem total em placa a 30°C, observada em 182 amostras de hambúrguer congelado, variava entre 10^6 e 10^8 UFC/g. A contagem de *E. coli* situou-se entre 10^3 e 10^5 NMP/g e de *S. aureus* entre 3 e 10^2 NMP/g. *Salmonella* sp. foi isolada em 32,4% das amostras, predominando *Salmonella typhimurium*.

Torner et al. (1995), na Espanha, constataram que, das 26 amostras de hambúrguer analisadas, 62,5% apresentavam contagens acima dos padrões legais, sendo que 50% excederam a contagem máxima permitida para microrganismos aeróbios mesófilos (5×10^6 UFC/g), 19,2% ultrapassaram o limite para *E. coli* (5×10^2 NMP/g), 7,7% superaram o padrão estabelecido para microrganismos sulfito-redutores (1×10^2 UFC/g) e uma amostra (3,8%) estava contaminada com *Salmonella* (ausência em 25 g).

No Brasil, Almeida (1983) observou que, de um total de dez amostras de hambúrguer congelado adquiridas no comércio varejista de Campinas-SP, 70% apresentavam contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos acima de 3×10^6 UFC/g e 100% delas estavam contaminadas com microrganismos psicrófilos acima deste valor. Em quatro amostras obteve-se resultado positivo para estafilococos coagulase-positivos, variando a contagem entre 1×10^2 e 3×10^4 UFC/g. *Salmonella* sp. foi isolada de uma amostra e *Clostridium perfringens* estava presente em 0,1 g, em três amostras. Contagens de *Bacillus cereus* entre $2,0 \times 10$ e $3,9 \times 10^3$ UFC/g para foram obtidas em quatro das dez amostras analisadas.

Em Jaboticabal-SP, Rossi et al. (1985) constataram que 70% das amostras apresentavam contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos entre $3,0 \times 10^4$ e $3,0 \times 10^5$ UFC/g, 53% estavam contaminadas com microrganismos

psicrófilos entre 10^6 e 10^7 UFC/g. Nenhuma das trinta amostras analisadas apresentou contagem para *E. coli*, *S. aureus* e *C. perfringens*. Contagens para microrganismos mesófilos, variando entre $9,0 \times 10^3$ e $1,6 \times 10^5$ UFC/g, foram obtidas por Coelho & Barbosa (1993) em Araraquara-SP, e a presença de *E. coli* e *Salmonella* sp. foi observada em 16,6% das doze amostras analisadas.

Outros trabalhos realizados no Brasil demonstraram a contaminação de hambúrguer produzido industrialmente por *E. coli* enteropatogênica e *Yersinia enterocolitica* (Reis et al., 1980; Franco et al., 1987; Falcão, 1991).

1.1.2 Hambúrguer Produzido Artesanalmente

Segundo Rossi et al. (1985), no Brasil existem numerosos estabelecimentos que fabricam hambúrguer no próprio local de comercialização, geralmente sob condições higiênicas inadequadas e sem fiscalização sanitária permanente.

Na análise de amostras de hambúrguer produzido artesanalmente em uma lanchonete de Jaboticabal-SP, Rossi et al. (1985) observaram que 36,7% das amostras apresentavam contagem total de microrganismos mesófilos acima de 3×10^6 UFC/g e 73,5% estavam contaminadas por microrganismos psicrófilos acima de 1×10^6 UFC/g. A presença de *E. coli* a um nível de $2,4 \times 10^2$ a $4,6 \times 10^3$ NMP/g foi constatada em 20,0% das amostras e *S. aureus* acima de 1×10^3 UFC/g em 13,3%. Elevadas contagens para microrganismos mesófilos e coliformes totais e fecais e presença de *E. coli* foram também observadas por Coelho & Barbosa (1993) em Araraquara-SP.

Gill et al. (1997), no Canadá, avaliando a qualidade microbiológica de hambúrguer congelado preparado no próprio estabelecimento varejista, obtiveram valores de $3,5 \times 10^8$ UFC/g para contagem total a 25°C, $3,8 \times 10^3$ NMP/g de

coliformes totais e $8,1 \times 10^1$ NMP/g de *E. coli*. As altas contagens observadas foram atribuídas a condições inadequadas de armazenamento antes do congelamento.

1.1.3 Hambúrguer Pronto para o Consumo

A utilização de um tratamento térmico inadequado no preparo do hambúrguer pode resultar na sobrevivência de microrganismos, inclusive bactérias patogênicas responsáveis por enfermidades alimentares. Além disso, se o consumo não for imediato, e dependendo das condições de manutenção do produto após o aquecimento, existe também a possibilidade de crescimento microbiano (Duitschaeffer et al., 1977; Tamminga et al., 1982).

Segundo Karim (1977), a utilização de tratamento térmico adequado foi responsável pela redução das contagens de microrganismos mesófilos e coliformes totais, e pela ausência de *Staphylococcus* sp. e *Salmonella* sp. em hambúrgueres prontos para o consumo, coletados em estabelecimentos comerciais de Teerã.

Na análise de amostras de hambúrguer coletadas em estabelecimentos de "fast food" no Canadá, Duitschaeffer et al. (1977) não conseguiram isolar enterococos, coliformes, estafilococos, salmonela e *C. perfringens*; entretanto, contagem total a 21°C acima de 5×10^3 UFC/g, observada em 7 (6,5%) das amostras, poderia indicar, segundo os autores, má qualidade microbiológica do produto cru e tratamento térmico insuficiente durante o preparo. Amostras coletadas nesse mesmo tipo de estabelecimento, na Nova Zelândia, apresentaram contagem total de microrganismos mesófilos entre $4,1 \times 10^3$ e $>3,0 \times 10^6$ UFC/g e resultado presuntivo para coliformes totais entre 0 e $>1,8 \times 10^5$ UFC/100g (Fraser, 1977).

Coelho & Barbosa (1993) compararam a qualidade microbiológica de hambúrgueres produzidos artesanal e industrialmente, preparados para o consumo em estabelecimentos comerciais de Araraquara-SP. Os resultados obtidos revelaram que o produto cru, produzido de forma artesanal, apresentava carga microbiana superior ao do produto industrial. Entretanto, nos produtos prontos para o consumo, observou-se uma maior redução da população microbiana nas amostras produzidas artesanalmente que nas amostras produzidas industrialmente, o que foi atribuído à maior eficiência do processo de cocção utilizado no preparo do produto artesanal. *E. coli* e *Salmonella* sp. foram isolados de hambúrgueres prontos para o consumo produzidos industrialmente.

Tamminga et al. (1982) analisaram 395 hambúrgueres, coletados em estabelecimentos comerciais da Holanda, e obtiveram contagem total de microrganismos aeróbios a 30°C entre 10^5 e 10^7 UFC/g e de Enterobacteriaceae entre 10^2 e 10^5 UFC/g. *Salmonella* sp. foi isolada em 9,4% das amostras.

1.2 Surto de Enfermidade Alimentar Associados ao Consumo de Hambúrguer

Um surto ocorrido em 1969, na Alemanha, envolvendo 40 pessoas, foi relatado por Baumgart et al. (1971). A bactéria incriminada neste incidente foi *C. perfringens*, uma vez que a análise do hambúrguer e das fezes de duas pessoas acometidas pela doença revelou a presença de Clostridia em níveis de 3×10^7 UFC/g e 10^5 - 10^6 UFC/g, respectivamente.

Nos Estados Unidos, as investigações demonstraram que hambúrguer cru ou mal cozido contaminado por *Salmonella newport* foi responsável pela ocorrência de surtos em três diferentes estados americanos. Hambúrguer produzido em uma indústria de Dallas, Texas, foi considerado a fonte comum

destes incidentes. Fontaine et al. (1978) concluíram que a salmonela provavelmente foi introduzida na indústria através de carcaças contaminadas.

Os dois primeiros surtos devidos a *E. coli* O157:H7, e que foram intensivamente estudados, ocorreram em Oregon e Michigan em 1982. Quarenta e sete pessoas apresentaram sintomas da doença após terem consumido hambúrgueres mal cozidos, servidos em restaurantes de uma mesma companhia de “fast food” (Riley et al., 1983).

Segundo Ryan et al. (1986), em 1984, ocorreu outro surto envolvendo hambúrguer contaminado por *E. coli* O157:H7 em uma casa para pessoas idosas, no estado de Nebraska. Trinta e quatro pessoas foram acometidas pela doença, tendo ocorrido quatro mortes.

Entre o final do ano de 1992 e início de 1993, mais de 500 pessoas foram infectadas por *E. coli* O157:H7 após terem consumido hambúrgueres servidos em restaurantes de uma mesma companhia de “fast food”, em quatro estados do oeste dos Estados Unidos. Quatro pessoas vieram a falecer em consequência da doença (CDC, 1993). Segundo Mermelstein (1993), as investigações demonstraram que os hambúrgueres contaminados haviam sido produzidos em uma indústria sob inspeção federal localizada na Califórnia. Os hambúrgueres haviam sido cozidos até uma temperatura interna de 60°C (140°F), conforme recomendação vigente naquela época.

Em julho de 1993, segundo CDC (1994), outro surto envolvendo essa bactéria ocorreu na Califórnia. Nesse caso, hambúrguer mal cozido, preparado em ambiente doméstico, foi responsabilizado pelo surto.

No Colorado, entre junho e julho de 1997, hambúrguer de uma marca comercial distribuída nacionalmente foi incriminado em um surto causado por *E. coli* O157:H7 envolvendo 15 pessoas. A presença da bactéria foi comprovada

através da análise do produto coletado no freezer de duas pessoas acometidas pela doença, e levou a companhia fabricante a recolher do mercado os lotes potencialmente contaminados (CDC, 1997).

1.3 Tratamento Térmico Utilizado no Preparo de Hambúrguer

1.3.1 Letalidade Recomendada para o Tratamento

Salmonella sp. é utilizada pelo USDA como microrganismo padrão para o controle do processo de pasteurização de produtos de carne bovina (Snyder, 1992a).

Considerando-se os baixos números de *Salmonella* normalmente encontrados em alimentos, um tratamento térmico equivalente a 3D é considerado seguro, quando se trata de consumidores em perfeito estado de saúde. Entretanto, um tratamento térmico mais severo (7D) deve ser empregado quando o produto é destinado a indivíduos imunocomprometidos (Snyder, 1992b).

Segundo Orta-Ramirez et al. (1997), recentemente o USDA determinou, como letalidade padrão, que o processo térmico utilizado no preparo de hambúrguer deve promover uma redução de 5 ciclos logarítmicos na população de *Salmonella*.

No trabalho conduzido por Pflug (1997), a fim de avaliar a letalidade do processo de fritura de hambúrgueres, um tratamento térmico mais severo (8D), baseado na resistência térmica de *Salmonella* spp., foi considerado adequado para a obtenção de um produto final seguro.

1.3.2 Fatores Determinantes da Eficiência do Tratamento

A eficiência do tratamento térmico, e o consequente risco para a saúde do consumidor estão diretamente relacionados com as condições de tempo e temperatura empregadas no preparo do hambúrguer. Entretanto, a margem de segurança de qualquer processo de inativação térmica depende também do tipo e população inicial do microrganismo patogênico que se deseja destruir. Além disso, o efeito do calor nas propriedades organolépticas e funcionais do alimento também deve ser considerado (Mackey & Bratchell, 1989; Zaika et al., 1990).

Temperatura e Tempo

A ocorrência de surtos envolvendo hambúrguer mal cozido contaminado com *E. coli* O157:H7 levou os órgãos de saúde pública dos Estados Unidos a reavaliarem as condições de temperatura e tempo recomendadas para o processo térmico empregado no preparo de hambúrguer e outros produtos cárneos cominuídos.

O regulamento do USDA estabelece que no tratamento térmico de hambúrguer uma das seguintes combinações de temperatura e tempo seja adotada: 151°F/66,1°C durante 41 s, 153°F/67,2°C durante 26 s, 155°F/68,3°C durante 16 s ou 157°F/69,4°C durante 10 s (Davis & Cyrus, 1998). No preparo doméstico, uma temperatura de 160°F/71,1°C é recomendada (Anônimo, 1994).

Por outro lado, o "Food and Drug Administration" (FDA) recomenda o aquecimento de produtos cárneos cominuídos a 155°F/68°C por 15 s (ou 150°F/66°C por 1 min, 145°F/63°C por 3 min), e que alimentos crus de origem animal sejam aquecidos 25°F/14°C acima de 155°F/68°C para compensar tempos mais curtos de cozimento, mantendo-os cobertos durante 2 minutos para que o equilíbrio de temperatura seja obtido (Anônimo, 1994).

A temperatura final no interior do hambúrguer está diretamente relacionada com o tempo de aquecimento, ou seja, temperaturas mais altas são obtidas em tratamentos térmicos mais prolongados, com consequente aumento da taxa de letalidade (Kotula et al., 1977; Hague et al., 1994, Juneja et al., 1997b).

Davidson & Witty (1977) não conseguiram detectar *Salmonella* em produtos inoculados com cerca de 10^4 UFC/hambúrguer, fritos por 10 min (temperatura interna média de 71°C). Segundo os autores, a fritura durante 6 min (temperatura interna média de 59°C) promoveria a redução de um ciclo logarítmico na população do microrganismo.

Kotula et al. (1977) observaram que a população de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrófilos e coliformes totais, em hambúrgueres comerciais, diminuiu com o aumento do tempo de fritura.

Tamminga et al. (1982) processaram, em chapa elétrica comercial, hambúrguer inoculado com *S. typhimurium*, obtendo redução da população de dois e três ciclos logarítmicos, respectivamente, após 4,8 min (temperatura interna de 62°C) e 6,4 min (temperatura interna de 70°C) de fritura.

Um aumento do grau de destruição de *E. coli* O157:H7 com o aumento da temperatura interna do produto foi observado por Jackson et al. (1996), ao fritar hambúrgueres mantidos sob condições de armazenamento diversas, e aquecidos até uma temperatura interna de 54,4, 62,8 e 68,3°C. Quando os hambúrgueres foram fritos até 68,3°C, reduções da população da ordem de 3,0, 4,1 e 5,1 ciclos logarítmicos foram obtidas para o produto congelado e para aqueles mantidos a 3 e 15°C, respectivamente. A menor letalidade observada no produto congelado foi devida, segundo os autores, a uma menor velocidade de penetração de calor ou a mudanças fisiológicas na célula microbiana pelo efeito do congelamento.

Juneja et al. (1997b), ao fritarem hambúrgueres inoculados com *E. coli* O157:H7 a um nível de $4,0 \times 10^6$ UFC/g, observaram uma redução da população de aproximadamente dois ciclos logarítmicos quando a temperatura interna atingiu 56,1-56,7°C, o que foi atribuído ao efeito do calor na superfície do produto e na região próxima a ela. Segundo os autores, quando a temperatura no centro do hambúrguer atinge 56,7°C, a maior parte da camada externa está a uma temperatura acima de 71,1°C, que é altamente letal para *E. coli* O157:H7. Os resultados obtidos demonstraram também que, para cada aumento adicional de 5°C na temperatura do centro do produto, obteve-se a redução de um ciclo logarítmico na população do microrganismo. Deste modo, a fritura até 68,3°C foi equivalente a 4D.

O intervalo de tempo transcorrido entre a remoção do hambúrguer da fonte de calor e o consumo (tempo de espera), também pode contribuir para a letalidade do tratamento térmico. Os trabalhos realizados por Juneja et al. (1997b), Tamminga et al. (1982) e Sullivan et al. (1975) demonstraram que, após a remoção da chapa, a temperatura interna do produto aumentou ou se manteve constante durante um curto intervalo de tempo, promovendo um aumento da inativação de *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* e vírus, respectivamente. Um aumento da temperatura também foi observado por Liu & Berry (1996). Segundo Juneja et al. (1997b), este efeito se deve ao calor latente do produto.

População Inicial

Davidson & Witty (1977) fritaram hambúrgueres inoculados com cinco cepas de *Salmonella* durante 6 min, de forma que a temperatura média no centro do produto atingisse 59°C. Observaram que, na ocorrência de uma alta população inicial, decorrente da manutenção do hambúrguer a 12°C durante uma semana, em embalagem a vácuo, o processo térmico empregado não era suficiente para a

obtenção de um produto seguro. Os autores sugeriram que o aquecimento até uma temperatura mais alta (cerca de 70°C) seria mais adequado.

Contrariamente, Kotula et al. (1977), utilizando hambúrgueres produzidos industrialmente mantidos a 4°C durante 1, 5 ou 12 dias para aumentar a população inicial de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrófilos e coliformes totais, obtiveram, após a fritura, uma contagem menor nos produtos com população inicial mais elevada (5 e 12 dias) do que no produto mantido congelado ou refrigerado durante 1 dia.

1.3.3 Indicadores da Eficiência do Tratamento

Cor Interna do Produto

Segundo Hague et al. (1994), tipicamente a cor interna da carne cozida muda de vermelho para rosa e para marrom acinzentado, à medida em que a temperatura final aumenta. Entretanto, vários trabalhos realizados têm demonstrado que a cor aparente no interior do hambúrguer não deve ser utilizada como indicador de um cozimento completo do produto (Hague et al., 1994; Van Laack et al., 1996a; Berry, 1998a; Liu & Berry, 1996).

A ocorrência de escurecimento prematuro - fenômeno verificado em hambúrguer que apresenta uma aparência de "bem cozido", mesmo sem ter atingido uma temperatura considerada segura - consiste, segundo Berry (1998a), em problema de segurança alimentar. Através da avaliação visual da cor interna, Hague et al. (1994) verificaram que o produto aquecido até uma temperatura de 66°C apresentava cor marrom similar ao do hambúrguer cozido até 71°C.

O escurecimento prematuro do hambúrguer parece estar relacionado com o nível de oxidação da mioglobina antes do aquecimento (Van Laack et al., 1996a;

Warren et al., 1996). Entretanto, outros fatores como tipo de ingrediente adicionado (Van Laack, 1996b), aquecimento do produto após o descongelamento e tipo de embalagem empregada (Van Laack et al., 1996a) e congelamento/descongelamento lento na presença de ar (Cornforth, 1996), podem aumentar a ocorrência do escurecimento prematuro.

Um fenômeno oposto, em que o hambúrguer mantém a cor rosa avermelhada a temperaturas acima de 71°C, também foi observado por Mendenhall (1989), Cornforth (1996) e Van Laack (1996a,b), e é atribuído à utilização de carne com pH alto ($\text{pH} > 6,0$), o que inibe a desnaturação da mioglobina durante o aquecimento. Cornforth (1996) também verificou que algumas formulações com baixo teor de gordura precisavam ser aquecidas a uma temperatura interna de até 87°C para apresentarem uma coloração marrom. Segundo Berry (1998a), esta condição é de grande importância para as características sensoriais, uma vez que o aquecimento até uma cor marrom típica pode resultar num produto duro e seco, principalmente se o hambúrguer tiver baixo teor de gordura.

A falta de uma relação consistente entre a cor e a temperatura final do hambúrguer levou o USDA a recomendar aos consumidores para não confiarem na cor interna como indicador de um tratamento térmico seguro (Berry, 1998b).

Cor do Suco Liberado pelo Hambúrguer

A ausência de cor rosa no suco liberado pelo produto é considerado pelo USDA uma indicação de cozimento completo. Hague et al. (1994) observaram que a cor do suco tornava-se menos vermelha e mais amarela à medida em que a temperatura final do produto aumentava, permitindo distinguir os hambúrgueres aquecidos até 55, 60 e 66°C daqueles cozidos até uma temperatura de 71°C. Entretanto, além da cor do suco ser de difícil avaliação, ela só pode ser utilizada enquanto o produto está sob aquecimento. Assim que o hambúrguer é removido

da fonte de calor, o consumidor dispõe apenas da cor interna como indicador do grau de cozimento (Hague et al., 1994; Van Laack, 1996a).

Tempo de Processo e Temperatura Final do Produto

O USDA recomenda a utilização de termômetro durante o preparo do hambúrguer para verificar se uma temperatura segura foi atingida (USDA, 1997).

Segundo Hague et al. (1994), o monitoramento da temperatura interna durante o aquecimento com um instrumento preciso é o melhor método para assegurar que o produto atingiu 71°C. Entretanto, segundo os autores, alguns estabelecimentos que preparam alimentos e a maior parte das pessoas que preparam o produto em ambiente doméstico não dispõem deste instrumento. Assim, a avaliação visual da cor interna e da cor do suco liberado, ou o aquecimento durante tempo fixo são os métodos freqüentemente utilizados para esse controle.

Hague et al. (1994) observaram que o tempo de cozimento apresentava uma alta correlação ($R^2=0,96$) com a temperatura final do produto. Entretanto, segundo eles, quando o tempo de aquecimento é utilizado para controle do processo de fritura do hambúrguer, outros fatores devem ser considerados, tais como: tamanho e grau de compactação do produto, teor de gordura, adição de ingredientes, aquecimento a partir do produto congelado, descongelado ou refrigerado, temperatura inicial do produto antes do aquecimento, método de aquecimento e temperatura da fonte de calor.

Cross & Berry (citados por Hague et al., 1994) verificaram que, para obter um grau de cozimento similar, aumentando-se o tamanho do hambúrguer era necessário aumentar o tempo de aquecimento. Marksberry (citado por Hague et al., 1994) obteve tempos mais curtos de cozimento para produtos menos compactados. Um tempo de aquecimento mais longo foi observado por Van Laack

(1996) em hambúrguer embalado à vácuo do que em embalagem plástica comum, o que foi atribuído à estrutura mais compacta do produto.

Vários trabalhos têm avaliado a influência da gordura no tempo de aquecimento. Berry (1994) observou que o hambúrguer com 4% de gordura precisava ser aquecido por um tempo mais longo para atingir a mesma temperatura final do produto com 20% de gordura.

A influência do teor de gordura no tempo de fritura também foi observada por Liu & Berry (1996), que relataram tempo mais longo para o hambúrguer com 10% de gordura do que no produto com 20%.

Na avaliação de hambúrgueres contendo de 5 a 30% de gordura, Troutt et al. (1992b) observaram que, para atingir uma temperatura de 71°C, o produto com 5% de gordura necessitava de um tempo mais longo, os hambúrgueres com 10, 15, 20 e 25% eram intermediários, não havendo diferença significativa entre eles, e o produto com 30% de gordura precisava de um tempo mais curto.

Entretanto, quando foram fritos hambúrgueres com $pH > 6,0$, não foi observada diferença significativa no tempo de aquecimento até 71°C entre os produtos com teores variando entre 5 e 25% (Berry, 1998b).

Em outro trabalho, Berry (1998a) verificou, durante aquecimento de hambúrguer com 10% de gordura, que o produto elaborado com carne com pH alto ($pH > 6,2$) precisava ser aquecido por mais tempo para atingir 71°C do que o hambúrguer com pH normal ($pH\ 5,6-5,7$).

Troutt et al. (1992a), por sua vez, verificaram que o tempo de aquecimento era mais longo para os hambúrgueres com 5 e 10% de gordura, intermediário para 20% e mais curto para o produto contendo um teor de 30%. Entretanto, não foi observada uma diferença consistente no tempo de fritura relacionada com a

adição de diferentes substitutos de gordura aos hambúrgueres com teores de gordura de 5 e 10%.

Para atingir uma mesma temperatura interna, hambúrguer congelado precisou ser aquecido por mais tempo do que o produto descongelado ou mantido sob refrigeração (Davidson & Witty, 1977; Van Laack et al., 1996a).

Sullivan et al. (1975) constataram que hambúrguer com temperatura de 10°C precisava ser aquecido durante 7,9, 10,3 e 11,1 min para atingir, respectivamente, 60, 71 e 76,7°C, enquanto que o produto congelado precisava de 14, 17 e 18 minutos.

Tamminga et al. (1982) observaram que, para produzir a mesma letalidade, era necessário tempo mais curto para hambúrguer aquecido em “grill” doméstico (permite o aquecimento simultâneo dos dois lados), intermediário na fritura por imersão em óleo e mais longo em chapa comercial (aquecimento em um dos lados por vez), atribuindo estas diferenças à velocidade de penetração de calor.

No trabalho realizado por Kotula et al. (1977) pôde ser verificado que o tempo de fritura do hambúrguer diminuía com o aumento da temperatura da chapa. Ikediala et al. (1996) e Juneja et al. (1997b) também observaram a influência da temperatura da chapa na temperatura interna dos hambúrgueres.

Ikediala et al. (1996) obtiveram uma redução do tempo de fritura com o aumento do número de viragens durante o aquecimento. Juneja et al. (1997b), a fim de promover uma penetração de calor uniforme nos dois lados, viraram o hambúrguer a cada 45 s. Entretanto, segundo Ikediala et al. (1996), para garantir a formação de uma superfície crocante nos dois lados do produto, característica desejável para hambúrguer, recomenda-se que o produto seja virado uma só vez, entre a metade e 2/3 do tempo total de fritura.

Nos experimentos realizados por Liu & Berry (1996), observou-se uma grande variabilidade da temperatura interna em hambúrgueres aquecidos durante tempo constante. Do mesmo modo, nos experimentos que utilizaram a temperatura interna final do produto para controle do processo, uma variação significativa do tempo de fritura foi verificada. Davidson & Witty (1977), ao fritarem hambúrgueres durante tempo constante, também verificaram uma variação na temperatura interna final do produto.

Segundo Liu & Berry (1996), embora possa ser determinado um tempo médio para o hambúrguer atingir temperaturas seguras, existe uma grande probabilidade de sub ou super aquecimento do produto, se o tempo de exposição ao calor for mantido constante. No caso de super aquecimento, as características sensoriais do hambúrguer podem ser comprometidas, enquanto o sub aquecimento pode resultar em produto com qualidade higiênico-sanitária inadequada.

A temperatura interna final do hambúrguer, medida com precisão, é considerada o indicador mais seguro do aquecimento completo do produto (Hague et al., 1994; Liu & Berry, 1996). Entretanto, tem-se observado uma grande variabilidade na distribuição da temperatura dentro dos hambúrgueres, o que tem levado os pesquisadores a efetuarem a leitura em mais de um ponto durante o aquecimento, e a considerar a menor temperatura obtida na definição da segurança do processo (Jackson et al., 1996; Juneja et al., 1997b).

Segundo Jiang (1996) é difícil monitorar a temperatura durante o aquecimento do hambúrguer. O autor avaliou o perfil de temperatura durante o tratamento térmico e observou que o produto nem sempre atinge a temperatura máxima ao final do aquecimento. Ele verificou que a temperatura interna máxima pode ser atingida em tempos diferentes durante e após o processo, atribuindo este comportamento à heterogeneidade do produto.

Enzimas

Recentemente, alguns trabalhos têm sido realizados a fim de avaliar se a inativação de enzimas presentes na carne pode ser utilizada como indicador de um tratamento térmico seguro para hambúrguer (Orta-Ramirez et al., 1997; Davis & Cyrus, 1998; Sair et al., 1999).

1.3.4 Transferência de Calor em Hambúrguer

A transferência de calor no hambúrguer durante a fritura se processa através de três mecanismos: condução, convecção e radiação. Enquanto a transferência de calor no interior do produto se deve principalmente à condução, a convecção e a radiação são importantes para a superfície (Singh, 1996).

Uma vez que no preparo do hambúrguer são utilizados equipamentos com temperaturas relativamente altas, o aquecimento promove, inicialmente, a formação de uma crosta com baixa umidade. A água evapora na interface existente entre a crosta e a região interna com alta umidade e, à medida em que o aquecimento prossegue, a interface se move em direção ao centro do produto. Essa interface tem uma grande influência na temperatura final do centro geométrico do produto. Em hambúrgueres congelados submetidos a fritura, forma-se uma interface adicional, delimitando a região congelada da descongelada (Singh, 1996).

Modelos matemáticos têm sido propostos para descrever a transferência de calor em hambúrgueres durante o tratamento térmico (Singh, 1996; Ikediala et al., 1996).

2. *Listeria monocytogenes* EM CARNE BOVINA

Listeria monocytogenes é um microrganismo patogênico, responsável pela ocorrência de surtos e casos de enfermidade alimentar associados ao consumo de produtos cárneos. A natureza psicrotrófica de *L. monocytogenes* e sua notável resistência a condições adversas de pH, A_a e concentração de NaCl permitem-lhe uma distribuição ubíqua no ambiente dos abatedouros e indústrias processadoras. Sua comprovada relevância para a saúde pública tem estimulado o desenvolvimento de estudos para determinar sua ocorrência em carne e produtos cárneos, bem como para avaliar os efeitos de diferentes técnicas de processamento sobre o microrganismo (Ryser & Marth, 1991).

2.1 Caracterização e Classificação Taxonômica

Listeria é um microrganismo Gram positivo, na forma de bastonetes curtos, anaeróbio facultativo, não formador de esporos, catalase positivo, oxidase negativo, móvel a 25°C e imóvel a 35°C (ICMSF, 1996; Farber & Peterkin, 1991).

O gênero *Listeria* pertence ao sub-ramo *Clostridium*, junto com *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Brochothrix*, e compreende sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. murrayi* e *L. grayi* (ICMSF, 1996; Rocourt & Cossart, 1997).

2.2 Listeriose de Origem Alimentar

Dentro do gênero *Listeria*, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas; entretanto, em termos de saúde pública, *L. monocytogenes* é a espécie mais importante (Rocourt & Cossart, 1997).

Durante a década passada, a listeriose emergiu como uma das principais doenças de origem alimentar. Sua evolução, segundo Rocourt & Cossart (1997), é resultante da interação de vários fatores relacionados com mudanças nos padrões sociais, incluindo: a) progresso da medicina e conseqüente transição demográfica, determinante do aumento da população imunocomprometida e idosa, b) mudanças na produção primária de alimentos, tais como a produção de matéria-prima em grande escala, modificações na tecnologia de processamento de alimentos, expansão da indústria agroalimentar e desenvolvimento de sistemas de armazenamento refrigerado, c) mudanças nos hábitos alimentares, com aumento da demanda por alimentos refrigerados ou congelados prontos para o consumo e alimentos de fácil preparo, que necessitam de um aquecimento brando antes do consumo, e mudanças nas práticas de manipulação e preparo de alimentos.

Segundo ICMSF (1996) e Rocourt & Cossart (1997), 13 sorotipos de *L. monocytogenes* podem causar a doença; entretanto, 95% das cepas isoladas de pessoas doentes pertenciam a três sorotipos: 1/2a, 1/2b e 4b.

A dose infectante capaz de causar a doença em indivíduos sadios ou pertencentes ao grupo de risco (recém-nascidos, idosos, mulheres grávidas e pessoas imunocomprometidas) é desconhecida. Apesar de a dose infectante depender de vários fatores, inclusive susceptibilidade do indivíduo e virulência da cepa, dados obtidos na análise de alimentos envolvidos em surtos e casos de listeriose revelam que uma dose superior a 100 UFC/g geralmente é aceita como capaz de provocar a doença, não excluindo, entretanto, a possibilidade de que doses menores também possam ser infectantes (Farber & Peterkin, 1991; ICMSF, 1996; Rocourt & Cossart, 1997).

Segundo dados do CDC, a taxa de mortalidade da listeriose é mais alta do que a da infecção provocada por *E. coli* O157:H7. Nos Estados Unidos, em 1998,

E. coli O157:H7 causou 70 mortes em um número estimado de 10.000 a 20.000 casos, enquanto que 250 mortes foram atribuídas a *L. monocytogenes*, de um total de 1.100 casos (Uniscience News, 1999).

Embora os surtos confirmados de listeriose ocorridos na década de 80 tenham sido provocados principalmente por produtos vegetais e de laticínios, mais recentemente produtos cárneos (patê, língua de porco, carne de porco em conserva, salsicha de peru, frango) foram envolvidos, ou epidemiologicamente implicados, em surtos e casos esporádicos de listeriose (Farber & Daley, 1994; ICMSF, 1996; Rocourt & Cossart, 1997).

Entre outubro de 1998 e fevereiro de 1999, 11 pessoas morreram nos Estados Unidos, e mais de 70 ficaram doentes após terem ingerido alimento contaminado com uma cepa rara de *L. monocytogenes*, denominada tipo E. Salsicha para cachorro-quente foi o alimento envolvido no surto, o que levou a indústria fabricante a recolher o produto do mercado (Uniscience News, 1999).

2.3 Fontes de Contaminação

L. monocytogenes é uma bactéria que se encontra amplamente disseminada na natureza, motivo pelo qual é isolada frequentemente de solo, água e vegetação (Brackett, 1988; Comi et al., 1992; Fenlon et al., 1996; Rocourt & Cossart, 1997).

Há muito tempo tem-se conhecimento do envolvimento desta bactéria em doença animal. Segundo Ryser & Marth (1991), os animais infectados por *L. monocytogenes* podem apresentar sintomas aparentes da doença ou, no casos de infecção subclínica, excretar esta bactéria nas fezes por vários meses. Por este motivo, animais portadores assintomáticos têm sido considerados como uma importante fonte de contaminação.

Fenlon et al. (1996) observaram que animais alimentados com silagem, freqüentemente contaminada com *L. monocytogenes*, geralmente excretavam a bactéria nas fezes, e que o transporte dos animais a longas distâncias (mais de 100 Km) aumentava significativamente o nível de excreção de *Listeria*.

Skovgaard & Morgen (1988), na Dinamarca, constataram a presença de *L. monocytogenes* em 52% das amostras de fezes bovina, e sugeriram que a presença desta bactéria em carcaças poderia ser atribuída à contaminação fecal durante as operações de abate. Buncic (1991) obtiveram uma incidência de 19% e 29% para *L. monocytogenes*, quando foram analisados, respectivamente, fezes e nódulos retrofaríngeos internos, coletados em um abatedouro da Iugoslávia.

Lowry & Tiong (citados por Johnson et al., 1990), por sua vez, não conseguiram isolar *L. monocytogenes* na análise de 33 amostras de fezes bovinas. Segundo os autores, o couro do animal seria uma fonte mais importante de contaminação por *Listeria*, uma vez que obtiveram uma incidência de 17%. Segundo Rocourt & Cossart (1997), a área mais intensamente contaminada do abatedouro é a da esfolagem.

Segundo Johnson et al. (1990), considerando a existência de animais portadores assintomáticos, associada com a ampla disseminação do microrganismo na natureza, o que torna inevitável a contaminação do couro, provavelmente a carcaça será contaminada, mesmo adotando-se procedimentos cuidadosos durante a esfolagem e evisceração.

Entretanto, trabalhos conduzidos na França, Estados Unidos e Reino Unido têm demonstrado baixa incidência de *L. monocytogenes* na superfície de carcaças bovinas logo após o abate (Nicolas & Vidaud, citados por Johnson et al., 1990; McNamara, 1995; Fenlon et al., 1996).

Segundo Rocourt & Cossart (1997), *L. monocytogenes* tem sido encontrada tanto em áreas sujas quanto em áreas limpas dos abatedouros.

Um programa de monitoramento para determinar a incidência de *L. monocytogenes* em cortes de carne coletados em abatedouros dos Estados Unidos resultou no isolamento da bactéria em 122 (7,1%) das 1726 amostras analisadas no período de janeiro de 1987 a fevereiro de 1990 (Ryser & Marth, 1991).

Uma maior incidência desta bactéria em cortes após desossa e, principalmente, em carne moída, sugere que a contaminação provavelmente ocorre durante as operações de desossa, corte, trituração, etc., como consequência de superfícies, equipamentos, utensílios e manipuladores contaminados por *L. monocytogenes* (Johnson et al., 1990; Ryser & Marth, 1991; Fenlon et al., 1996).

Os resultados obtidos por Lowry & Tiong (citados por Johnson et al., 1990), na Nova Zelândia, revelaram uma incidência de *L. monocytogenes* em 20% dos cortes após a desossa, e a presença desta bactéria em 27 a 73% das superfícies de trabalho do abatedouro e em 40% das facas. Na Hungria, Durst & Berencsi (citados por Johnson et al., 1990) verificaram que 6% dos trabalhadores de um abatedouro excretavam *L. monocytogenes* nas fezes.

Segundo Ryser & Marth (1991), estas fontes de contaminação são de grande importância, principalmente para carne comercializada no varejo, onde uma maior incidência desta bactéria tem sido observada.

2.4 Sobrevivência e Multiplicação em Carne e Hambúrguer

Johnson et al. (1988) verificaram que *L. monocytogenes* sobrevive em carne bovina moída mantida a 4°C durante 2 semanas, sem alteração da população, independente da permeabilidade da embalagem ao oxigênio. Resultado similar foi observado por Shelef (1989), após armazenamento a 4°C durante 40 dias e a 25°C por 24 horas.

Hefnawy et al. (1993) e Harmayani et al. (1993) constataram que a adição de diferentes ingredientes, tais como sorbato, nitrito e nitrato de sódio, não tinha qualquer influência na sobrevivência de *L. monocytogenes* em carne moída mantida a 4°C; entretanto, a bactéria foi incapaz de se multiplicar.

Gouet et al. (citados por Ryser & Marth, 1991) avaliaram a multiplicação de *L. monocytogenes* em carne moída estéril, inoculada com uma microflora definida e mantida a 8°C durante 17 dias. Os resultados obtidos demonstraram que alguns microrganismos inibiam, enquanto outros favoreciam a multiplicação da bactéria. Os autores observaram que a multiplicação de *L. monocytogenes* dependia do aumento do pH da carne, promovido pelo prévio crescimento de determinados microrganismos, como por exemplo *Pseudomonas fluorescens*. Concluiu-se, então, que o crescimento de *L. monocytogenes* em carne era possível se o pH fosse maior que 6,0.

No trabalho realizado por Kaya & Schmidt (1989), utilizando condições similares, foi observada a multiplicação em carne moída estéril após 10 dias de armazenamento a 4°C, verificando-se também que a presença de determinados microrganismos e o nível de contaminação da carne influenciavam o crescimento de *L. monocytogenes*.

Rosso et al. (1996) observaram que o aumento da temperatura de 4 para 8°C, durante o armazenamento de carne bovina moída, reduzia em 75-80% o

tempo necessário para *L. monocytogenes* atingir uma densidade populacional pré-estabelecida.

Dickson (1990) inoculou *L. monocytogenes* na superfície de cortes bovinos com baixo nível de contaminação inicial, verificando que a multiplicação da bactéria a 5°C era dependente do teor de gordura do tecido muscular.

Os resultados obtidos por Grau & Vanderlinde (1990), utilizando carne não estéril, demonstraram que o aumento da população de *L. monocytogenes* na superfície de cortes embalados a vácuo, e mantidos a 0 e 5,3°C era influenciado significativamente pela temperatura de armazenamento, pH e teor de gordura da carne.

Alguns autores têm demonstrado que a bactéria também sobrevive e se multiplica em hambúrguer bovino.

McCart et al. (citados em Anônimo, 1995) avaliaram o efeito da redução do teor de gordura e da adição de substitutos de gordura (proteína de soja, amido e carragena) na sobrevivência de *L. monocytogenes*, em hambúrgueres embalados a vácuo e mantidos sob refrigeração. Após uma semana de armazenamento, não foi observada diferença na população associada com as formulações. Entretanto, após quatro semanas, os resultados demonstraram maior sobrevivência nos produtos adicionados de substitutos de gordura.

Cabedo et al. (1998) verificaram a sobrevivência de *L. monocytogenes*, sem alteração da população, no produto armazenado a 4°C durante 8-10 dias, observando-se, entretanto, a multiplicação da bactéria quando foram utilizadas condições para simular abuso de temperatura (12°C durante 4-6 dias).

Barbosa et al. (1995) testaram a sobrevivência e a multiplicação do microrganismo em hambúrguer com 4% de gordura e com dois valores de pH (5,5

e 6,1), embalados a vácuo e armazenados a 4°C. Os resultados indicaram, segundo os autores, que, embora a multiplicação da bactéria seja lenta, ela ocorre mais rapidamente nos produtos com pH maior que 6,0 e é dependente também da cepa utilizada.

Segundo Farber & Peterkin (1991) e Rocourt & Cossart (1997), *L. monocytogenes* é capaz de multiplicar-se em carne bovina; entretanto, o crescimento é dependente da temperatura, pH e teor de gordura da carne, tipo e quantidade da microflora contaminante presente e da adição de ingredientes de cura.

2.5 Incidência, Sorotipos e Nível de Contaminação em Carne Moída

Segundo Shelef (1989), trabalhos sobre a ocorrência e quantificação de *L. monocytogenes* em carne bovina moída são de grande importância, uma vez que os produtos elaborados com ela são frequentemente consumidos após um breve tratamento térmico, o que pode não inativar todas as células viáveis.

Em vários países têm sido constatada a contaminação de carne bovina moída por *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. Entretanto, observa-se grande variação na incidência de contaminação, o que, segundo Farber & Peterkin (1991), se deve, em parte, a diferenças no método de detecção, número de amostras analisadas, número de colônias isoladas submetidas a confirmação quanto à capacidade hemolítica, e fonte de coleta das amostras (indústria ou estabelecimentos varejistas).

Segundo Brackett (1988), os resultados de um estudo realizado nos Estados Unidos indicaram que cerca de 70% das amostras de carne moída estavam contaminadas por *L. monocytogenes*.

No Canadá, utilizando oito diferentes procedimentos de enriquecimento/isolamento, Truscott & McNab (1988) verificaram a presença de *Listeria* spp. em 45 das 50 amostras (90%) de carne moída coletadas no comércio varejista. *L. monocytogenes* foi detectada em 29 amostras (58%). Uma alta incidência de *L. monocytogenes* (77,3%) foi observada por Farber et al. (1989) nesse mesmo país, tendo sido verificado que mais de 80% pertenciam ao sorogrupo 1.

Analisando amostras coletadas em açougues e supermercados da Dinamarca, Skovgaard & Morgen (1988) constataram a contaminação de carne moída por *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em 67 e 28% das amostras, respectivamente. Os autores observaram maior prevalência de *Listeria* nas amostras coletadas no verão (90%) do que no inverno (57%).

Trabalhos realizados na França por Bind, Dumur et al., Le Guilloux et al. e Poumeyrol (citados por Ryser & Marth, 1991) demonstraram uma incidência de contaminação por *L. monocytogenes* variando entre 8 e 51%. Poumeyrol (citado por Ryser & Marth, 1991) verificou o predomínio do sorotipo 1/2 nas cepas isoladas.

Os resultados obtidos por Comi et al. (1992), na Itália, evidenciaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 16% das 148 amostras analisadas. Das amostras positivas, 91,6% tinham menos que 10^2 UFC/g, enquanto que 8,4% apresentaram contagem entre 10^2 e 2×10^3 UFC/g. Uma incidência de 8,75% foi obtida por Poeta et al. (1993) na análise de 80 amostras coletadas no comércio varejista desse país.

Na Suíça, Breer & Schopfer (citados por Ryser & Marth, 1991 e Sheridan et al., 1994) isolaram *Listeria* em 33% das amostras de carne bovina moída, e observaram que 42% das amostras positivas continham <10 UFC/g e 58% estavam contaminadas a um nível entre 10 e 10^3 UFC/g.

Karches & Teufel (1988) verificaram a presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, respectivamente, em 86 e 46% das amostras coletadas em estabelecimentos varejistas da Alemanha. Utilizando o método do “Número Mais Provável”, os autores obtiveram contagens inferiores a 10^2 /g nas amostras positivas para listeriae. Neste mesmo país, Schoen & Terplan (citados por Ryser & Marth, 1991), observaram uma incidência de *L. monocytogenes* em 30% das amostras, enquanto que Weis (citado por Farber & Peterkin, 1991), isolaram esta bactéria em 52,4% das amostras de carne moída adquiridas em indústrias e no comércio varejista. Os testes realizados nas cepas isoladas de carne bovina moída revelaram o predomínio do sorotipo 1/2.

Na Escócia, de 23 amostras de carne moída analisadas, 21 (91,3%) estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (Fenlon et al., 1996).

A análise de amostras coletadas em estabelecimentos varejistas de Dublin (Irlanda) demonstrou que 68% estava contaminada por *Listeria* e 5% das amostras foram positivas para *L. monocytogenes*. A maior parte (60%) das amostras positivas para listeriae apresentaram contagens entre 5 e 50 UFC/g, o que, segundo Sheridan et al. (1994), coincide com os resultados obtidos por Breuer & Prandl em estudo realizado na Áustria, onde contagens entre 12 e 110 NMP/g foram obtidas em 61% das amostras.

Lowry & Tiong (citados por Ryser & Marth, 1991) verificaram que 92% das amostras de carne moída adquiridas em açougues e supermercados da Nova Zelândia estavam contaminadas por *L. monocytogenes*.

No Brasil, Mesquita (1991) observou a ocorrência de contaminação por *Listeria* spp. em 48% das 50 amostras de carne bovina moída coletadas no comércio varejista de Goiânia/GO. Das amostras positivas foram isoladas 24 cepas, sendo 23 (95,9%) de *L. innocua* e uma (4,1%) de *L. monocytogenes*. Uma incidência mais elevada foi obtida por Destro et al. (1991) na cidade de

Campinas/SP. Analisando 20 amostras coletadas em supermercados, os autores constataram a presença de *Listeria* na totalidade das amostras. As incidências obtidas para *L. monocytogenes* e *L. innocua* foram, respectivamente, de 65 e 95%.

A coexistência de várias estirpes de *Listeria* em uma mesma amostra de carne é comum. Em vários trabalhos realizados, observou-se que a incidência de *L. innocua* em carne bovina moída é similar ou pouco superior à de *L. monocytogenes*, o que sugere que estas duas espécies ocupam nichos semelhantes em abatedouros ou em instalações de manipulação e processamento de carne (Johnson et al., 1990; Ryser & Marth, 1991).

Trabalhos realizados em diferentes países têm evidenciado o predomínio dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c em carne e produtos cárneos; entretanto, a ocorrência dos sorotipos 3c, 4b e 4c em carne bovina moída também tem sido observada (Farber & Peterkin, 1991; Ibrahim & Mac Rae, 1991; Comi et al., 1992)

2.6 Efeito do Congelamento e Incidência em Hambúrguer

Segundo Speck & Ray (1977), a presença de bactérias patogênicas em alimentos congelados pode ser um perigo insuspeitado para a saúde do consumidor, uma vez que os meios seletivos normalmente empregados na detecção desses microrganismos não permite a recuperação de células injuriadas.

Alguns trabalhos realizados têm demonstrado a resistência de *L. monocytogenes* ao congelamento e armazenamento congelado.

Golden et al. (1988) congelaram tubos contendo caldo triptose fosfato (TPB) inoculado com quatro diferentes cepas de *L. monocytogenes* e observaram

que a população viável foi reduzida em apenas 3 a 6% após 14 dias de armazenamento a -18°C. Entretanto, baseados no aumento da sensibilidade das células a NaCl após o congelamento, os autores afirmaram que até 82% da população viável encontrava-se injuriada. Resultados similares foram obtidos por Lammerding & Doyle (citados por Johnson et al., 1990), usando solução salina tamponada e sete semanas de armazenamento sob congelamento.

El-Kest et al. (1991) avaliaram o efeito do método de congelamento e da temperatura de armazenamento sobre *L. monocytogenes* Scott A inoculada em tampão fosfato e caldo triptose. Os autores verificaram que o congelamento rápido seguido de armazenamento em nitrogênio líquido a -198°C não teve nenhum efeito sobre as células, enquanto que o armazenamento a -18°C após congelamento rápido ou lento promoveu morte e injúria da bactéria.

Palumbo & Williams (1991), utilizando inoculação artificial de carne bovina moída, constataram a resistência de *L. monocytogenes* ao congelamento e ao armazenamento congelado (-18°C) por 14 semanas, mantendo-se a população viável praticamente constante durante todo o período estudado. Entretanto, em contraste ao observado por Golden et alii (1988), os autores, empregando plaqueamento em ágar triptose fosfato (TPA) com 5% de NaCl e outros meios seletivos, verificaram que *L. monocytogenes* não era injuriada pelo processo de congelamento, nem pelo armazenamento congelado, atribuindo essa diferença ao efeito protetor do alimento. Warburton et al. (1992) também obtiveram recuperação quantitativa de *L. monocytogenes* em alimentos congelados utilizando meios seletivos.

A resistência de *L. monocytogenes* ao congelamento em carne moída contaminada artificialmente também foi constatada por Kaya & Schmidt (1989), permanecendo constante a população em aproximadamente 10^5 UFC/g durante seis meses de armazenamento a -18°C.

Gianfranceschi & Aureli (1996) inocularam duas cepas de *L. monocytogenes* em cinco tipos de alimentos e avaliaram o efeito do congelamento (-50°C) e do armazenamento prolongado (8-10 meses) a -18°C na sobrevivência e injúria da bactéria. Os resultados obtidos após o processo de congelamento mostraram que *L. monocytogenes* era bastante resistente à morte e injúria, principalmente quando inoculada em hambúrguer bovino. Os autores também observaram uma redução de apenas 0,5 ciclo logarítmico na população viável após o período de armazenamento, e uma maior resistência da cepa Scott A. Sage & Ingham (1998) também verificaram que *E. coli* O157:H7 era bastante resistente ao processo de congelamento (-20°C) quando inoculada em hambúrguer, observando, igualmente, uma diferença de resistência entre as cepas.

Segundo Speck & Ray (1977), a inativação e a intensidade da injúria de células bacterianas em alimentos congelados depende de uma série de fatores, inclusive do tipo de bactéria, composição do alimento e método de congelamento.

A ocorrência de contaminação natural por *L. monocytogenes* em carne bovina moída congelada foi observada por McClain & Lee (1988) nos Estados Unidos. De um total de 41 amostras coletadas em indústrias e estabelecimentos varejistas, 48,8% estavam contaminadas por esta bactéria.

L. monocytogenes também tem sido observada em hambúrguer congelado. Nicolas & Vidaud (citados por Farber & Peterkin, 1991) verificaram a presença da bactéria em 26,2%, de um total de 149 amostras coletadas em indústrias e estabelecimentos varejistas da França. No estudo conduzido por Poeta et al. (1993) uma incidência de 7,25% foi obtida na análise de amostras adquiridas em supermercados da Itália.

Na Irlanda, Sheridan et al. (1994) constataram a presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, respectivamente, em 97 e 18% dos hambúrgueres, de um total

de 94 amostras congeladas coletadas em estabelecimentos varejistas de Dublin. Os autores observaram que 51% das amostras positivas para *Listeria* apresentavam contagens entre 5 e $<10^2$ UFC/g, 46% estavam contaminadas a níveis variando entre 10^2 e 10^4 UFC/g e 3% apresentavam mais que 10^4 UFC/g. Os resultados obtidos após recuperação de células injuriadas demonstraram que a contagem de algumas amostras havia sido subestimada em 1,5-2,5 ciclos logarítmicos. As elevadas contagens de *Listeria* obtidas neste estudo indicaram, segundo os autores, que carne de má qualidade fora utilizada no processamento e que um possível descongelamento durante a produção e/ou distribuição possibilitou o crescimento do microrganismo no alimento.

2.7 Resistência Térmica

Segundo Mackey & Bratchell (1989), o tratamento térmico é um ponto crítico de controle para *L. monocytogenes* durante o processamento e preparo de muitos alimentos; portanto, dados confiáveis sobre a resistência térmica dessa bactéria são essenciais para definir um tratamento térmico seguro.

Em 1980 já havia interesse sobre a resistência térmica de *Listeria* em produtos cárneos crus, quando Karaioannoglou & Xenos (citados por Johnson et al., 1990) relataram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em bolinhos de carne bovina inoculados com 10^4 - 10^5 UFC/g e cozidos até uma temperatura interna de 75-85°C. Apesar de o microrganismo ter sido detectado em uma das quatro amostras inoculadas com 10^3 UFC/g, não foi isolado daquelas inoculadas com 10^2 UFC/g.

Mais recentemente, a obtenção de resultados conflitantes quanto à resistência de *L. monocytogenes* ao processo de pasteurização do leite e a ocorrência desta bactéria em produtos cárneos cozidos estimularam a realização

de uma série de trabalhos, a fim de avaliar a sobrevivência de *L. monocytogenes* aos processos térmicos comumente empregados na conversão de carne “in natura” em produtos prontos para o consumo (Ryser & Marth, 1991).

Boyle et al. (1990) investigaram a destruição térmica de *L. monocytogenes* Scott A em tubos fechados contendo carne bovina moída (20% de gordura) inoculada com 10^7 - 10^8 UFC/g, e observaram a sobrevivência da bactéria em amostras aquecidas até uma temperatura interna de 50, 60 e 65°C, utilizando plaqueamento direto em meio seletivo. Células viáveis também foram detectadas após enriquecimento seletivo em amostras cozidas até 70°C.

Em microbiologia de alimentos, a resistência térmica de microrganismos é definida através de dois parâmetros, *D* e *z*. O valor *D*, a uma temperatura constante, é o tempo necessário para a população sobrevivente ser reduzida em um ciclo logarítmico, enquanto o valor *z* define a variação de temperatura necessária para promover uma variação de 10 vezes no valor *D*. Conhecendo-se estes dois parâmetros é possível calcular a extensão da destruição microbiológica em processos de aquecimento de alimentos (Miles & Mackey, 1994).

L. monocytogenes é considerada uma bactéria mais resistente ao calor do que muitos outros microrganismos patogênicos não formadores de esporos responsáveis por enfermidades alimentares (Mackey & Bratchell, 1989; Boyle et al., 1990; Mackey et al., 1990; Ryser & Marth, 1991; Schoeni et al., 1991; Huang et al., 1992; Linton et al., 1995).

Schoeni et al. (1991) e Fain et al. (1991) compararam os valores *D* obtidos em seus experimentos com os resultados observados por Goodfellow & Brown (1978), e concluíram que *L. monocytogenes* era mais resistente ao calor em carne bovina moída do que *Salmonella*.

Entretanto, segundo Sorqvist (1994), a comparação de resultados obtidos em diferentes estudos deve ser feita com cautela, uma vez que vários fatores podem ter influência na resistência térmica da bactéria, incluindo, entre outros, as propriedades do meio de aquecimento (ex: pH, teor de água, gordura, carboidratos, proteínas e sais), composição do meio e temperatura de crescimento da bactéria, fase de crescimento, cepas utilizadas, ocorrência de um choque térmico prévio e velocidade de aquecimento. Além disso, a técnica empregada no tratamento térmico e os meios empregados para contagem das células sobreviventes também podem contribuir para a obtenção de resultados diferentes (Gaze et al., 1989; Schoeni et al., 1991; Ollinger-Snyder et al., 1995).

Uma padronização das condições experimentais empregadas foi proposta pelo "National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods" (NACMCF), que desenvolveu um guia de procedimentos para os estudos de avaliação da resistência térmica de *L. monocytogenes* em alimentos refrigerados com vida-de-prateleira prolongada (Brown, 1991).

2.7.1 Propriedades do Meio de Aquecimento

Boyle et al. (1990) verificaram que *L. monocytogenes* Scott A era mais resistente em pasta de carne (1 carne:4 água) do que em tampão fosfato, atribuindo este fato a diferenças na composição dos substratos. Os valores *D* a 60, 65 e 70°C, obtidos em tampão fosfato e em pasta de carne, foram 0,63, 0,29 e 0,15 min, e 2,54, 0,75 e 0,23 min, respectivamente.

Gaze et al. (1989), utilizando uma pasta de carne estéril mais consistente (3 carne:2 água), obtiveram valores *D* para *L. monocytogenes* Scott A de 8,32 min a 60°C e 0,20 min a 70°C, enquanto que para *L. monocytogenes* NCTC 11994 os

valores encontrados a 60 e 70°C foram 6,27 e 0,14 min, respectivamente. Um valor z de 5,98°C foi obtido para as duas estirpes.

Os resultados obtidos nos experimentos realizados por Jorgensen et al. (1995), demonstraram que *L. monocytogenes* Scott A era mais resistente em carne bovina moída do que em caldo triptose fosfato (TPB). Os autores observaram que o tempo necessário para obter uma redução de quatro ciclos logarítmicos na população do microrganismo a 60°C era de 1,7 e 4,1 min, respectivamente, para TPB e carne moída.

Doherty et al. (1998) avaliaram a resistência térmica de *L. monocytogenes* NCTC 11994 em carne bovina moída com 2,35% de gordura e obtiveram valores D de 43,5min a 50°C, 3,14 min a 55°C e 0,24 min a 60°C.

No estudo realizado por Schoeni et al. (1991), após remoção asséptica da camada superficial, a carne com 10% de gordura foi moída e inoculada com uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes*. Os valores D encontrados a 54,4, 57,2, 60,0 e 62,8°C foram, respectivamente, 22,4, 15,7, 4,47 e 2,56 min quando meio não seletivo foi empregado para contagem dos sobreviventes, enquanto que os valores obtidos através de contagem em meio seletivo foram 19,3, 17,6, 3,5 e 2,82 min, nas mesmas temperaturas. Os autores observaram também que os valores D obtidos no tratamento térmico de carne moída proveniente de animal artificialmente contaminado por *L. monocytogenes* Scott A eram consideravelmente menores, o que foi atribuído a maior sensibilidade desta estirpe ao calor.

Segundo Golden et al. (1988) alguns componentes específicos presentes no meio de aquecimento podem influir na suscetibilidade da célula bacteriana à destruição térmica.

Vários trabalhos realizados têm demonstrado que a gordura protege a célula bacteriana do efeito do calor. Segundo Ahmed et al. (1995), tipicamente, o aumento do teor de gordura resulta numa redução da umidade, o que poderia justificar a menor destruição das células em produtos com teores de gordura mais elevados.

Fain et al. (1991), após redução dos contaminantes, avaliaram a resistência térmica de *L. monocytogenes* Scott A em carne bovina moída com diferentes teores de gordura. Os autores, empregando contagem em meio para recuperação de células injuriadas, verificaram que a 51,7, 57,2 e 62,8°C os valores *D* em carne moída com 2,0% de gordura eram 81,3, 2,6 e 0,6 min, respectivamente; na carne com 30,5% de gordura, valores de 71,1, 5,8 e 1,2 min foram obtidos. Os valores *z* encontrados foram de 5,17 e 6,33°C, para carne com baixo e alto teor de gordura, respectivamente. Os resultados demonstraram, também, que a utilização de meio seletivo para contagem dos sobreviventes teve influência nos valores *D*, principalmente a 51,7°C, quando foi observada uma redução da ordem de duas vezes nos valores obtidos.

Nos trabalhos realizados por Line et al. (1991) e Ahmed et al. (1995) observou-se aumento do valor *D* para *E. coli* O157:H7 em função do aumento do teor de gordura da carne moída. Filppi & Banwart (1974) também observaram o efeito protetor da gordura do hambúrguer sobre o vírus da poliomielite tipo 1. Entretanto, Mackey et al. (1990) verificaram que a adição de gordura (30%) à carne bovina moída não exerceu efeito significativo na resistência térmica de *L. monocytogenes* entre 55 e 70°C.

Buncic et al. (1993), por sua vez, constataram que a adição de gordura à carne de porco moída reduzia os valores *D* a 62°C para *L. monocytogenes*, e que a adição de 20 e 40% de água ao produto promovia uma redução ainda mais intensa.

Tamminga et al. (1982), comparando a resistência térmica de *S. typhimurium* em carne para hambúrguer com 15 e 30% de gordura, verificaram que não havia diferença significativa nos valores D determinados entre 50 e 70°C para os dois tipos de produto.

Kotrola et al. (1997) avaliaram a resistência térmica de *E. coli* O157:H7, e não observaram qualquer efeito protetor da gordura sobre as células submetidas a aquecimento em produtos de peru com diferentes teores de gordura.

Mackey et al. (1990) investigaram a resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina moída e constataram que o valor D aumentava duas vezes devido a adição de sal de cura, composto por nitrito, nitrato e NaCl. Efeito semelhante foi observado por Farber (1989), utilizando uma mistura de ingredientes de cura (nitrito, dextrose, lactose, xarope de milho e NaCl). Nesse caso, os valores $D_{58^{\circ}\text{C}}$ e $D_{62^{\circ}\text{C}}$ passaram, respectivamente, de 6,39 e 1,01 min, na ausência dos ingredientes, para 50,0 e 7,06 min, na presença dos mesmos, representando um aumento de cerca de cinco a oito vezes no tempo de redução decimal.

Yen et al. (1991) avaliaram o efeito dos ingredientes de cura na destruição térmica de *L. monocytogenes* em carne de porco moída com 15% de gordura, submetida a aquecimento até 60°C. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de NaCl, dextrose e fosfatos de sódio reduziu a destruição da bactéria, enquanto que nitrato, nitrito e eritorbato de sódio não tiveram nenhum efeito protetor. A adição da mistura completa de cura promoveu a maior proteção às células. Em trabalhos posteriores, Yen et al. (1992a,b) verificaram que a proteção conferida pela mistura de ingredientes de cura só era efetiva quanto o produto era aquecido até temperaturas inferiores a 67°C, e que a adição de k-carragena diminuía o efeito protetor da mistura de cura.

A adição de outros ingredientes não-cárneos também pode ter influência na resistência da célula bacteriana ao calor.

Harmayani et al. (1993) observaram que a adição de k-carragena e de uma mistura com função ligante à carne bovina moída resultou em menor inativação de *L. monocytogenes* durante aquecimento até 65°C.

Ollinger-Snyder et al. (1995), avaliando a resistência térmica de *L. monocytogenes* Scott A em carne de porco moída, com ou sem adição de farelo de soja, constataram que não havia diferença significativa nos valores *D* obtidos para os dois produtos a 50, 55 e 60°C. Entretanto, outros pesquisadores demonstraram que a adição de derivados protéicos de soja à carne tem influência na resistência térmica de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*.

Trabalho realizado por pesquisadores da Universidade Estadual de Kansas (EUA), revelou que a adição de proteína de soja ao hambúrguer bovino permitiu a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 ao aquecimento até uma temperatura final de 68,3°C (Anônimo, 1995).

Craven & Blankenship (1983) inocularam uma mistura de 5 cepas de *Salmonella* em carne bovina moída contendo derivados protéicos de soja e observaram um aumento significativo dos valores *D* a 54 e 60°C quando a carne foi suplementada com 30% de proteína texturizada de soja, concentrado protéico ou proteína isolada de soja. Os autores verificaram também um aumento da sobrevivência da bactéria a partir de 20% de proteína texturizada de soja, quando foram testados teores variando entre 0 e 50%. A maior resistência térmica observada na carne contendo derivados de soja foi atribuída à elevação do pH do produto de 5,8-5,9 para um valor maior ou igual a 6,1.

Segundo Craven & Blankenship (1983), a resistência térmica de muitas bactérias é influenciada pelo pH do meio de aquecimento. Cole et al. (1993)

observaram um aumento significativo da sensibilidade de *L. monocytogenes* ao calor quando o pH do caldo triptose fosfato foi reduzido de 7,0 até 4,2. Resultado similar foi obtido por Linton et al. (1995), em tampão fosfato, ao variar o pH de 7,0 até 5,0.

Vários trabalhos têm avaliado o efeito do cloreto de sódio na resistência térmica de *L. monocytogenes*.

Linton et al. (1995, 1996) verificaram que o aumento do teor de NaCl (0 a 4%) no meio de aquecimento aumentava a resistência da bactéria a 50, 55 e 60°C. Um efeito significativo deste sal entre 56 e 62°C também foi observado por Cole et al. (1993) ao submeter o microrganismo a aquecimento em tampão fosfato com uma concentração de 9% de NaCl.

No estudo realizado por Jorgensen et al. (1995) foi avaliado o efeito do choque osmótico (3, 6 e 9% de NaCl) e da adaptação das células a estas concentrações salinas na tolerância de *L. monocytogenes* ao calor. Os resultados obtidos em caldo triptose fosfato após o choque osmótico (duração menor que 5 min) mostraram que o aumento da concentração de NaCl resultou em aumento progressivo da resistência térmica da bactéria a 60°C. Os autores observaram também que as células crescidas a concentrações elevadas de sal ficavam ainda mais resistentes ao calor (aumento de 2 a 4 vezes em relação às células submetidas ao choque osmótico).

Em testes realizados com carne bovina moída, Jorgensen et al. (1995) verificaram que *L. monocytogenes*, crescida em caldo triptose fosfato com 0,5% de NaCl, inoculada em carne com um teor de 6,5% do sal (9,0% em relação ao teor de umidade) e submetida a tratamento térmico a 60°C 15 min após a inoculação, apresentou um valor *D* 2,6 vezes maior que a inoculada em carne sem adição de sal. Por outro lado, quando as células cresceram em TPB com

9,0% de NaCl e foram aquecidas na carne com esta mesma concentração, o valor $D_{60^{\circ}\text{C}}$ obtido foi 10 vezes superior.

Yen et al. (1991), utilizando carne de porco moída inoculada com uma mistura de 9 cepas de *L. monocytogenes* e submetida a aquecimento até 60°C, observaram que a adição de 1, 2 e 3% de NaCl promovia uma redução da inativação térmica da ordem de 0,7, 2,1 e 3,0 ciclos logarítmicos, respectivamente, quando comparado com a carne não adicionada de sal.

Posteriormente, Yen et al. (1992a) verificaram que o efeito protetor do NaCl (2%) dependia da temperatura final de aquecimento (50 a 68°C), observando uma proteção mais evidente das células no tratamento térmico até 60°C. O aquecimento até temperaturas mais elevadas (65 e 68°C) resultou em destruição similar à da carne sem sal.

Estudos realizados para avaliar a influência dos sais na resistência térmica de diferentes microrganismos têm mostrado que existe uma relação entre a A_a ou a pressão osmótica do meio de aquecimento e a tolerância do microrganismo ao calor. Entretanto, a influência dos sais na resistência térmica depende de vários fatores, inclusive tipo e fase de crescimento do microrganismo, condições de crescimento antes do tratamento térmico, composição, temperatura e propriedades físico-químicas do meio de aquecimento e, ainda, tipo e concentração do sal (Tuncan & Martin, 1990).

2.7.2 Cepas Utilizadas

Mackey et al. (1990) testaram a resistência térmica de 29 diferentes cepas de *L. monocytogenes* em caldo triptona soja, e verificaram que o valor D a 57°C variava entre 6,5 e 26 min, ficando a média em 16,3 min. As duas cepas de

L. innocua testadas apresentaram, nesta mesma temperatura, valores *D* de 23 e 14 min.

Sorqvist (1994) avaliaram 12 cepas de *L. monocytogenes* pertencentes a diferentes sorotipos, em solução fisiológica, e observaram diferenças significativas na resistência térmica entre os sorotipos e entre as cepas dentro do mesmo sorotipo.

Diferenças na resistência térmica entre cepas de *L. monocytogenes* também foram observadas por Golden et al. (1988), usando caldo triptose fosfato, o que, segundo os autores, enfatiza a necessidade de se testar várias estirpes, a fim de estabelecer parâmetros confiáveis, que possam ser utilizados com segurança no tratamento térmico de alimentos.

Lund et al. (1989) obtiveram, em caldo nutriente, valores *D* a 60°C de 4,3 e 3,6 min para *L. monocytogenes* F4642 e ATCC 19115, respectivamente, enquanto que a mistura de 8 cepas apresentou um valor de 5,4 minutos.

No experimento conduzido por Farber (1989), utilizou-se carne moída irradiada, inoculada com dez diferentes estirpes de *L. monocytogenes*, e foram obtidos valores *D* variando entre 13,18 min a 56°C e 1,01 min a 62°C, e um valor *z* igual a 4,92°C. Mackey et al. (1990), por sua vez, inocularam em carne moída uma cepa resistente, previamente selecionada, e obtiveram os valores $D_{60^{\circ}\text{C}}=3,8$ min, $D_{65^{\circ}\text{C}}=0,93$ min, $D_{70^{\circ}\text{C}}=0,14$ min e $z=7,2^{\circ}\text{C}$.

Huang et al. (1992) e Bhaduri et al. (1991) também observaram diferenças na resistência térmica entre as cepas de *L. monocytogenes* submetidas a aquecimento em outros tipos de produtos cárneos.

2.7.3 Temperatura e Fase de Crescimento

Trabalhos realizados com diferentes espécies bacterianas demonstraram um aumento da tolerância ao calor com o aumento da temperatura de crescimento (Pagan et al., 1997).

Pagan et al. (1997), utilizando células na fase estacionária, avaliaram a influência da temperatura de crescimento na resistência térmica de *L. monocytogenes*. Os autores verificaram, após aquecimento em caldo tripticase soja adicionado de extrato de levedura, que o valor D era maior para células crescidas a 37°C ($D_{62^{\circ}\text{C}}=0,53$ min) do que a 4°C ($D_{62^{\circ}\text{C}}=0,23$ min).

Nos trabalhos realizados por Pagan et al. (1998) e Juneja et al. (1998) foi observado que a influência da temperatura de crescimento dependia do pH e composição do meio. Entretanto, quando foi utilizado meio de cultura ou tampão citrato-fosfato para o crescimento, ambos com pH 7,0, verificou-se uma maior resistência das células incubadas a 37°C do que a temperaturas inferiores.

Bhaduri et al. (1991) empregaram pasta de fígado suíno para investigar a resistência térmica de células de *L. monocytogenes*, previamente crescidas a 19 e 37°C em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI). Os valores $D_{60^{\circ}\text{C}}$ obtidos para as células que cresceram a 19 e 37°C foram, respectivamente, 0,8 e 1,6 minutos.

A fase de crescimento em que a população bacteriana se encontra antes do tratamento térmico também tem influência na resistência térmica. Vários trabalhos têm demonstrado que uma população na fase estacionária de crescimento é mais resistente do que na fase exponencial. Uma vez que esta é a condição mais freqüentemente encontrada na natureza, experimentos para avaliação da resistência térmica utilizando bactérias nesta etapa de crescimento

representam a situação mais realista (e pessimista) do ponto de vista agroalimentar (Bréand et al., 1998).

Lou & Yousef (1996) verificaram o efeito da fase de crescimento na resistência térmica de *L. monocytogenes* em tampão fosfato e obtiveram, a 56°C, valores *D* de 1,0 e 8,6 min para as células na fase exponencial e estacionária, respectivamente.

Pagan et al. (1998) observaram que, qualquer que fosse a temperatura de crescimento utilizada, a resistência térmica aumentava durante a incubação até atingir a fase estacionária de crescimento. A resistência máxima das células crescidas a 4, 20 ou 37°C foi obtida, respectivamente, após 14 dias, 36 e 18 horas de incubação.

Os mecanismos envolvidos no aumento da resistência térmica poderiam estar relacionados a algumas mudanças fisiológicas que a célula sofre na fase estacionária, tais como: decréscimo de tamanho, redução da permeabilidade e fluidez da membrana, aumento da resistência a autólise, aumento da hidrofobia e viscosidade superficial, redução do metabolismo global e síntese de proteínas do "stress" (Lou & Yousef, 1996).

2.7.4 Choque Térmico e Velocidade de Aquecimento

Qualquer temperatura acima da ótima de crescimento pode ter efeito letal sobre os microrganismos. Entretanto, vários trabalhos têm demonstrado que muitas espécies microbianas, quando submetidas a tratamento térmico lento ou a aquecimento por um curto intervalo de tempo a temperaturas acima da temperatura ótima de crescimento, adquirem maior tolerância ao calor. Os pesquisadores acreditam que estas temperaturas induzem a uma reação fisiológica que leva as células a sintetizarem proteínas especiais conhecidas

como “proteínas do choque térmico”. Embora as “proteínas do choque térmico” pareçam ter uma função na proteção dos microrganismos aos efeitos do calor e de outros tipos de estresse, o mecanismo de ação ainda não é bem entendido, e não se sabe ao certo se existe relação direta de causa e efeito entre a síntese dessas proteínas e a aquisição de maior resistência ao calor (Pagan et al., 1997).

O “choque térmico”, já demonstrado com outras células bacterianas, também ocorre com *L. monocytogenes*, que pode produzir de 12 a 14 diferentes “proteínas do choque térmico” (Farber & Brown, 1990; Pagan et al., 1997).

Linton et al. (1990) avaliaram a resistência de *L. monocytogenes* após choque térmico em caldo e verificaram que o tratamento térmico a 48°C durante 20 minutos foi a condição que promoveu a máxima resistência ao aquecimento subsequente. Os valores *D* a 55°C aumentaram 2,3 e 1,6 vezes quando foram empregados, respectivamente, meio não seletivo e meio seletivo na recuperação dos sobreviventes.

Os resultados obtidos por Pagan et al. (1997), por sua vez, mostraram que a máxima tolerância ao calor induzida pelo choque térmico em *L. monocytogenes* dependia da temperatura e da duração do choque térmico. Os autores verificaram também que, embora células crescidas a 4°C fossem menos resistentes ao calor, o choque térmico a 42,5°C durante 180 minutos promoveu um aumento da ordem de 6 vezes no valor $D_{62^{\circ}\text{C}}$, enquanto que as células crescidas a 37°C tiveram um aumento de 3 vezes, não havendo, nesta condição, diferença significativa entre os valores $D_{62^{\circ}\text{C}}$ das células crescidas nestas temperaturas. *L. monocytogenes* submetida a choque térmico (42,5°C/180min) manteve a resistência térmica após armazenamento a 4°C durante 24 horas.

Farber & Brown (1990), avaliando o efeito do choque térmico usando mistura curada de carne suína e bovina, observaram que a manutenção da

bactéria a 48°C durante 60 e 120 minutos antes do aquecimento final a 64°C promoveu um aumento da ordem de 1,4 e 2,4 no valor *D*, respectivamente, quando comparado com células que não sofreram choque térmico.

Hansen & Knochel (1996), por sua vez, verificaram que o efeito do choque térmico (46°C durante 30 min) sobre *L. monocytogenes* em carne bovina moída era dependente do pH, não observando diferença significativa nos valores *D* a 60°C quando o pH da carne era 5,4 ou 5,8. Entretanto, quando o pH foi ajustado para 6,2, o valor *D* obtido foi 2,4 vezes maior do que o encontrado para células que não sofreram choque térmico.

Segundo Farber & Brown (1990), o efeito do choque térmico é particularmente importante para carnes submetidas a aquecimento lento durante o preparo (produtos tipo “sous vide”) e para produtos mantidos em condição tépida antes do reaquecimento.

O processo “sous vide” é caracterizado pelo acondicionamento do produto a vácuo em embalagem de alta barreira e estável ao calor, seguido de pasteurização e rápido resfriamento antes do armazenamento abaixo de 3°C. Os alimentos tipo “sous vide” são submetidos, geralmente, a tratamentos térmicos a baixa temperatura (55°C) por um longo período de tempo, com o objetivo de manter as características de sabor, aroma e textura do produto. Estas condições de processamento, apesar de favorecerem a obtenção de um alimento de melhor qualidade, têm despertado preocupação quanto aos riscos microbiológicos envolvidos (Linton et al., 1990; Hansen & Knochel, 1996).

Stephens et al. (1994) estudaram a influência da velocidade de aquecimento em caldo na resistência térmica de *L. monocytogenes*. Observaram que as células submetidas a uma velocidade de aquecimento menor que 5,0°C/min desenvolviam maior tolerância a um tratamento térmico subsequente a

60°C do que as células aquecidas a uma taxa maior ou igual a 5,0°C/min. À medida em que a velocidade de aquecimento foi reduzida de 5,0 para 0,7°C/min, observou-se um aumento proporcional da resistência térmica.

No trabalho realizado por Quintavalla & Campanini (1991) foi utilizada emulsão de carne curada de porco e observou-se que o aquecimento a temperatura constante resultou em valor *D* de 7,3 min a 60°C e 3,0 min a 63°C, enquanto que, utilizando-se aquecimento à velocidade de 0,5°C/min, os valores *D* encontrados foram 12,95 e 5,4 min para 60 e 63°C, respectivamente.

Os resultados obtidos por Hansen & Knochel (1996) com carne bovina moída, entretanto, não confirmaram o efeito da velocidade de aquecimento na resistência térmica de *L. monocytogenes*, observado por outros autores. Os autores verificaram que não havia diferença significativa entre os valores *D* a 56, 60 e 64°C para os tratamentos térmicos que utilizaram aquecimento rápido (maior que 10°C/min) e lento (0,6 e 0,3°C/min), e atribuíram este resultado ao pH (5,6) da carne utilizada.

2.7.5 Outras Condições de Estresse

Durante o processamento, os microrganismos podem ser submetidos a outros tipos de estresse, além do osmótico e do promovido pelo calor, tais como: falta de nutrientes e exposição a ácidos, etanol e agentes oxidantes (Lou & Yousef, 1996).

O trabalho desenvolvido por Lou & Yousef (1996) demonstrou que a adaptação de *L. monocytogenes* à falta de nutrientes e doses subletais de etanol, acidez e H₂O₂ aumentou de maneira significativa a resistência das células ao calor.

2.8 Injúria Subletal Promovida pelo Calor

Quando *L. monocytogenes*, assim como outras bactérias não formadoras de esporos, é submetida a condições físicas ou químicas em nível subletal, pode ocorrer injúria estrutural e fisiológica, resultando, inclusive, na incapacidade das células em crescer e formar colônias em meios sólidos contendo agentes seletivos. Entretanto, quando incubadas em meios não seletivos, nutricionalmente ricos, as células injuriadas podem se recuperar e crescer, tornando possível sua contagem (Mossel, 1989; Smith, 1990; Ryser & Marth, 1991; Warburton et al., 1992).

Há fortes evidências de que células bacterianas injuriadas subletalmente mantêm suas propriedades patogênicas e sua virulência. Assim, em alimentos contendo células injuriadas, se forem dadas condições favoráveis para recuperação, há possibilidades reais de ocorrência de enfermidade alimentar (Mossel, 1989; Smith & Palumbo, citados por Warburton et al., 1992).

McCarthy (1991), testando a patogenicidade de células de *L. monocytogenes* 1A1 em camundongos imunocomprometidos, observou que células não injuriadas e células recuperadas da injúria pelo calor apresentavam o mesmo nível de patogenicidade, enquanto que as células injuriadas pelo calor eram consideravelmente menos patogênicas. Os resultados obtidos por Bunduki et al. (1996) também indicaram que as células de *Listeria* recuperadas da injúria pelo calor adquiriam novamente atividade citotóxica sobre células epiteliais mamárias de bovino.

Os meios comumente utilizados na detecção e enumeração de *Listeria* spp. em amostras de alimentos contêm substâncias inibidoras que impedem a recuperação e subsequente formação de colônias por células injuriadas pelo calor, gerando assim a possibilidade de obtenção de resultado falso-negativo ou

contagem subestimada da bactéria (Buchanan et al., 1988; Warburton et al., 1992).

Vários trabalhos têm demonstrado que a presença de componentes como: feniletanol, acriflavina, sulfato de polimixina B, cloreto de sódio, telurito de potássio, moxalactam, ciclohexamida e tiosulfato de sódio, mesmo em pequenas quantidades, é capaz de impedir a recuperação e crescimento das células injuriadas. (Buchanan et al., 1988; Ryser & Marth, 1991).

A fim de avaliar a capacidade dos meios sólidos seletivos em quantificar *Listeriae* injuriada, foi preciso desenvolver métodos para diferenciar as células normais das células injuriadas (Ryser & Marth, 1991). Beuchat et al. (1986) e Smith & Archer (citados por Buchanan et al., 1988), então, observaram que células sadias e subletalmente injuriadas pelo calor poderiam ser diferenciadas através da tolerância ao cloreto de sódio.

Smith & Archer (citados por Buchanan et al., 1988) verificaram que células não aquecidas de *L. monocytogenes* Scott A cresciam rapidamente em ágar triptose fosfato (TPA) com ou sem adição de 5% de NaCl. Entretanto, quando a cultura foi submetida a aquecimento a 52°C em tampão fosfato (0,1M, pH 7,2), um número menor de células foi recuperado em placas contendo 5% de NaCl. Esta perda de tolerância a cloreto de sódio, segundo os autores, é indicativo de células subletalmente injuriadas.

Beuchat et al. (1986), utilizando ágar triptona soja (TSA) com diferentes níveis de NaCl, observaram também uma maior injúria em TSA contendo 4% de NaCl do que em TSA com 2% de NaCl, sugerindo que *L. monocytogenes* pode sofrer diferentes graus de injúria pelo calor. No trabalho realizado por Golden et al. (1988) também foi utilizada a tolerância a NaCl para determinar a intensidade da injúria de *L. monocytogenes* durante o tratamento térmico.

No trabalho realizado por Golden et al. (1988), utilizando TPA com 4% de NaCl, verificou-se a existência de cepas mais resistentes a injúria. Os resultados mostraram também que a maior parte da população sobrevivente ao aquecimento em caldo triptose fosfato a 52, 54 e 56°C encontrava-se injuriada; entretanto, foi observado um aumento da taxa de inativação a partir de 54°C.

Patel & Beuchat (1995) inocularam *L. monocytogenes* Scott A em leite integral e em caldo filtrado de repolho e de carne bovina. Os autores observaram, através de contagem em TPA e TPA com 4% de NaCl, que 40% das células foram injuriadas em caldo de carne, enquanto que 79 e 94% foram injuriadas em leite e caldo de repolho, respectivamente, após aquecimento a 52°C durante 20 minutos.

A sensibilidade de *L. monocytogenes* ao cloreto de sódio também tem sido utilizada para avaliar injúria promovida por outras condições estressantes, tais como congelamento, falta de nutrientes e exposição a ácidos, H₂O₂ e etanol (Golden et al., 1988; Palumbo & Williams, 1991; Lou & Yousef, 1996; Gianfranceschi & Aureli, 1996).

Smith & Archer (citados por Buchanan et al.; 1988), buscaram um aperfeiçoamento do método de diferenciação das células injuriadas e constataram que a utilização de TPA com 1% de piruvato de sódio (TPAP) permitia a obtenção de contagens sem alteração do número de células viáveis, ao se aquecer a cultura de *L. monocytogenes* a 52°C por um período de tempo de até 60 minutos. Quando amostras idênticas foram plaqueadas em TPA com 5% de NaCl (TPAS), a contagem diminuiu com o decorrer do tempo de aquecimento. Segundo os autores, a contagem em TPAP representa o número total de células (injuriadas e não injuriadas), a contagem em TPAS representa o número de células não injuriadas e, portanto, o número de células injuriadas pode ser obtido através da diferença entre as duas contagens (TPAP menos TPAS).

Segundo Smith (1990), o acúmulo de H_2O_2 , atribuído à redução da atividade da catalase, parece ser uma reação universal em células submetidas a injúria, verificando-se também que as células injuriadas apresentam maior sensibilidade aos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio.

Dallmier & Martin (1988) mostraram que a atividade da catalase em extratos de células de 4 cepas de *L. monocytogenes* diminuiu drasticamente a temperaturas entre 55 e 60°C, e que a enzima superóxido-dismutase foi ainda mais sensível ao calor.

O efeito benéfico do piruvato de sódio é atribuído, portanto, à sua capacidade de decomposição do H_2O_2 , removendo o efeito tóxico, o que, conseqüentemente, favorece a recuperação das células injuriadas (Farber et al., 1988; Smith, 1990).

Apesar de ter sido observado por alguns pesquisadores que a adição de piruvato de sódio a meios de plaqueamento seletivo resultava em aumento da recuperação de células de *S. aureus* e *S. typhimurium* injuriadas pelo calor, a adição de 1 a 3% de piruvato aos meios de McBride modificado e Vogel-Johnson modificado não promoveu aumento na recuperação de *L. monocytogenes* Scott A injuriada pelo calor (Smith, 1990; Smith & Buchanan, 1990). Farber et al. (1988), entretanto, verificaram um efeito benéfico na adição de piruvato ao meio de McBride modificado, após incubação das placas a 22-25°C por 7 dias. Resultados obtidos por Busch & Donnelly (1992) demonstraram também o efeito positivo da adição de piruvato de sódio em caldo de enriquecimento na recuperação de *L. innocua* e *L. monocytogenes* injuriadas pelo calor.

Utilizando o método desenvolvido por Smith & Archer, descrito anteriormente, Buchanan et al. (1988) investigaram a capacidade de 10 diferentes meios de plaqueamento seletivo em recuperar células de listeriae injuriadas pelo

calor (Tabela 1). Os autores observaram que, embora contagens similares de células não injuriadas tenham sido obtidas em todos os meios testados, a maior parte deles foi incapaz de detectar uma considerável parcela de células injuriadas pelo calor.

TABELA 1: Recuperação de células de *L. monocytogenes* injuriadas pelo calor utilizando vários meios de plaqueamento seletivo

Meios	Recuperação de Células Injuriadas (%)
Ágar base com ácido nalidíxico (GBNA)	102
Ágar triptose fosfato com 1% de piruvato de sódio (TPAP) (controle positivo)	100
Ágar Vogel-Johnson sem telurito	89
Ágar ciclohexanodiona ácido nalidíxico feniletanol (CNPA)	88
Ágar feniletanol	74
Caldo UVM + 2% ágar	64
Ágar McBride modificado (MMLA)	61
Ágar Vogel-Johnson com telurito	45
Ágar Baird-Parker	30
Ágar triptose fosfato com 5% de NaCl (TPAS) (controle negativo)	0
Ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM)	-21
Caldo enriquecimento FDA + 2% ágar	-25

Fonte: Ryser & Marth (1991), adaptado de Buchanan et al. (1988)

Smith & Hunter (1988) avaliaram o efeito da adição de solutos na injúria de *L. monocytogenes* Scott A submetida a aquecimento a 52°C em tampão fosfato (pH 7,2). Os resultados mostraram que NaCl, KCl e alguns açúcares e polióis (por ex: galactose, sacarose, lactose, glicerol e manitol) protegeram a célula da injúria promovida pelo calor, enquanto que NH₄Cl ou frutose não tiveram nenhum efeito

protetor, apresentando, inclusive um efeito letal para as células. Segundo os autores, a A_a parece não ser o fator determinante da proteção conferida pelo soluto contra a injúria pelo calor.

No trabalho realizado por Smith et al. (1982), verificou-se que o aumento da concentração de NaCl (1 a 9%) em pasta de carne bovina (1 carne:3 água) aquecida a 49°C durante 90 minutos resultou em redução da população de *S. aureus* injuriada pelo calor.

Segundo Ryser (1996), a restauração da síntese de RNAm e de proteínas e a restauração da fosforilação oxidativa são essenciais para *Listeria* se recuperar da injúria promovida pelo calor. O autor, utilizando aquecimento de caldo triptose fosfato a 56°C, verificou que a extensão da injúria de *L. monocytogenes* estava relacionada com a redução da atividade de cinco enzimas intracelulares que têm uma importante função na síntese de ácidos nucleicos, síntese protéica e de ATP.

Há divergências quanto à temperatura de incubação mais adequada para recuperação de células injuriadas pelo calor, mesmo em meios sólidos não seletivos. Bunning et al. (1988), utilizando plaqueamento em TSA-YE, obtiveram contagens 3 a 10 vezes superiores após incubação a 25°C/7 dias, quando comparadas com 37°C/2 dias. Entretanto, em estudo similar, Smith & Archer (citados por Smith, 1990), utilizando TPA, verificaram que listeriae se recuperavam totalmente, ou quase totalmente, da injúria provocada pelo calor após apenas 6-9 horas a uma temperatura de incubação variando entre 20 e 40°C, readquirindo resistência a NaCl e outros agentes seletivos. Incubação a temperaturas mais baixas (5 e 12°C), por sua vez, levaram a um decréscimo da recuperação.

2.9 Letalidade Recomendada para *L. monocytogenes* em Produtos Cárneos

A margem de segurança ou eficiência de qualquer processo de destruição térmica é função do número inicial do microrganismo que se pretende inativar; entretanto, os dados existentes sobre o nível de contaminação de *L. monocytogenes* em carne e produtos cárneos são muito limitados (Zaika et al., 1990).

Zaika et al. (1990) verificaram que a condição normalmente utilizada no processamento de salsicha (70 minutos para o produto atingir uma temperatura interna de 71,1°C) era suficiente para inativar *L. monocytogenes*, se a população fosse menor ou igual a 10^3 UFC/g. Entretanto, considerando as informações existentes de que *Listeria* pode ocasionalmente ocorrer em carne até este nível de contaminação, um tratamento térmico equivalente a 3D foi considerado pouco seguro, e levou o USDA a recomendar o aquecimento do produto a 65,5°C durante 1,48 minutos, a fim de obter uma redução da população de *L. monocytogenes* da ordem de 4 ciclos logarítmicos (Zaika et al., 1990; Huang et al., 1992).

Os processos térmicos recomendados pelo USDA para pasteurização de produtos cárneos são baseados numa redução de 7 ciclos logarítmicos (7D) na população de *Salmonella* spp., o que equivale a 4D para *L. monocytogenes*, tendo em vista a maior resistência térmica desta bactéria (Snyder, 1992a).

Um tratamento térmico de 4D para *L. monocytogenes* também foi recomendado pelo "United States National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods" (USNACMCF) para o processamento de produtos cárneos prontos para o consumo ou que necessitam de pouco ou nenhum aquecimento antes do consumo, e que são embalados e mantidos sob refrigeração durante um prolongado período de tempo (USNACMCF, 1991).

Tendo em vista o grupo de risco passível de infecção por *L. monocytogenes*, a possibilidade da bactéria poder crescer no alimento e assumindo uma contaminação inicial de 10^2 UFC/g, Ollinger-Snyder et al. (1995) e Huang et al. (1992) consideraram que um tratamento térmico equivalente a 4D em produtos cárneos poderia não ser suficientemente seguro.

Além disso, segundo Linton et al. (1996), as recomendações de um processo térmico equivalente a 4D para *L. monocytogenes* são baseadas em simples redução logarítmica da população ou, no caso de curvas não lineares, na inclinação da porção linear da curva de sobrevivência. Entretanto, segundo os autores, vários trabalhos têm demonstrado que a destruição térmica nem sempre é uma reação de primeira ordem, e esta condição deve ser considerada no estabelecimento de processos térmicos seguros.

Mackey et al. (1990) formularam uma equação que permite o cálculo de tempos de processamentos seguros, baseada numa inativação de 7D para *L. monocytogenes* em carne, considerando os “shoulders” pronunciados observados em seus experimentos. Segundo a equação:

$$\log_{10} t = 10,3943 - 0,14618 T$$

onde t = tempo de processamento (min) e T = temperatura de aquecimento ($^{\circ}\text{C}$), um tratamento térmico a 70°C por 1,45 min é suficiente para reduzir a população de *L. monocytogenes* em sete ciclos logarítmicos, concordando, portanto, com Gaze et al. (1989), que declararam que, na maioria das vezes, o aquecimento a 70°C por 2 min é considerado seguro para a inativação *L. monocytogenes* presente em carne “in natura”.

Apesar da possibilidade de sobrevivência ao tratamento térmico (Farber, 1989), *L. monocytogenes* parece não ser capaz de se multiplicar durante o resfriamento.

Juneja et al. (1997a) inocularam três cepas da bactéria em carne bovina moída estéril que, após acondicionamento em embalagem a vácuo, foi submetida a aquecimento durante 1 hora, até a temperatura interna atingir 60°C. Em seguida, a carne foi resfriada de 54,4 a 7,2°C dentro de 6 a 21 horas, simulando-se assim diferentes velocidades de resfriamento. Os autores verificaram que a população sobrevivente permaneceu constante mesmo quando o resfriamento ocorreu em 21 horas.

Entretanto, segundo Harrison & Carpenter (1989), as condições de temperatura durante o armazenamento até o consumo são de fundamental importância, uma vez que, sob abuso de temperatura (10°C), *L. monocytogenes* pode se multiplicar no produto subprocessado, dependendo do tipo de embalagem.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHMED, N.M.; CONNER, D.E.; HUFFMAN, D.L. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.3, p.606-610, May-June, 1995.
2. ALMEIDA, R.C.C. **Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas, vendidos no varejo no município de Campinas**. Campinas, 1983. 103p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
3. ANÔNIMO. FSIS to McDonald's: patties should be cooked to 157°F. **Food Chemical News**, Washington, v.35, n.49, p.29-30, Jan., 1994.
4. ANÔNIMO. Cooked color deceptive in fat-replaced beef patties. **Food Chemical News**, Washington, v.37, n.19, p.8-9, July, 1995.
5. ANÔNIMO. Frozen, raw beef patties for food service. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v.17, n.7, p.427-431, July, 1997.
6. BARBOSA, W.B.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R.; SMITH, G.C. Growth potential of individual strains of *Listeria monocytogenes* in fresh vacuum-packaged refrigerated ground top rounds of beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n.4, p.398-403, Apr., 1995.

7. BAUMGART, J.; ASSAKAWA, Y.; HECHELMANN, H. A heat-sensitive β -haemolytic *Clostridium perfringens* (Hobbs type 1 and 4) causing food poisoning. **Archiv für Lebensmittelhygiene**, v.22, n.1, p.7-11, 1971.
Apud: Food Science and Technology Abstracts, Chicago, v.3, n.7, p.1130, C125, 1971.
8. BERRY, B.W. Fat level, high temperature cooking and degree of doneness affect sensory, chemical and physical properties of beef patties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.1, p.10-14, 19, Jan.-Feb., 1994.
9. BERRY, B.W. Color of cooked beef patties as influenced by formulation and final internal temperature. **Food Research International**, Oxford, v.30, n.7, p.473-478, Aug., 1998a.
10. BERRY, B.W. Cooked color in high pH beef patties as related to fat content and cooking from the frozen or thawed state. **Journal of Food Science**, Chicago, v.63, n.5, Sept.-Oct., 1998b.
11. BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E.; HAO, D.Y.Y.; CONNER, D.E. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.32, n.10, p.791-795, Oct., 1986.
12. BHADURI, S.; SMITH, P.W.; PALUMBO, S.A.; TURNER-JONES, C.O.; SMITH, J.L.; MARMER, B.S.; BUCHANAN, R.L.; ZAIKA, L.L.; WILLIAMS, A.C. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in liver sausage slurry. **Food Microbiology**, London, v.8, n.1, p.75-78, Mar., 1991.

13. BOYLE, D.L.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and in ground beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.2, p.327-329, Mar.-Apr., 1990.
14. BRACKETT, R.E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.162-164, 178, Apr., 1988.
15. BRÉAND, S.; FARDEL, G.; FLANDROIS, J.P.; ROSSO, L.; TOMASSONE, R. Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v.40, n.3, p.185-195, Apr., 1998.
16. BROWN, W. Designing *Listeria monocytogenes* thermal inactivation studies for extended-shelf-life refrigerated foods. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.4, p.152-153, Apr., 1991.
17. BUCHANAN, R.L.; SMITH, J.L.; STAHL, H.G.; ARCHER, D.L. *Listeria* methods development research at the eastern regional research center, U.S. Department of Agriculture. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p.651-654, May-June, 1988.
18. BUNCIC, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat , and in meat products in Yuscoslavia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, n.2-3, p.173-180, Feb., 1991.

19. BUNCIC, S.; PAUNOVIC, L.; VOJINOVIC, G.; RADISIC, D. The effect of fat and moisture on the thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in minced meat. **Tehnologija-Mesa**, v.34, n.1, p.32-34, 1993. *Apud: Food Science and Technology Abstracts*, 94-06-S0095, CD-ROM.
20. BUNDUKI, M.M.C.; ZAVIZION, B.A.; POLITIS, I.; DONNELLY, C.W. Virulence of culture filtrate from heat injured and repaired *Listeria* strains: assay on bovine mammary epithelial (MAC-T) cells. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.9, p.932-937, Sept., 1996.
21. BUNNING, V.K.; DONNELLY, C.W.; PEELER, J.T.; BRIGGS, E.H.; BRADSHAW, J.G.; CRAWFORD, R.G.; BELIVEAU, C.M.; TIERNEY, J.T. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.2, p.364-370, Feb., 1988.
22. BURZYNSKA, H.; BACHRYJ, F.; BOROWIAK, M.; CHYBOWSKA, J.; CZARNOWSKA, W.; DABROWA, B.; DZIURROWICZ, Z.; MACIAESZEK, A.; WANACKA, I. Sanitary evaluation of semi-manufactured minced meat products. **Roczniki-Panstwowego-Zakladu-Higieny**, v.22, n.3, p.321-332, 1971. *Apud: Food Science and Technology Abstracts*, Chicago, v.4, n.1, p.175, S28, 1972.
23. BUSCH, S.V.; DONNELLY, C.W. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.1, p.14-20, Jan., 1992.

24. CABEDO, L.; SOFOS, J.N.; SMITH, G.C. Bacterial growth in ground beef patties made with meat from animals fed diets without or with supplemental vitamin E. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.1, p.36-40, Jan., 1998.
25. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers- western United States, 1992-1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.42, n.14, p.258-263, Apr., 1993.
26. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to home-cooked hamburger-California, july 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.43, n.12, p.213-216, Apr., 1994.
27. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers -Colorado, 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.46, n.33, p.777-778, Aug., 1997.
28. COELHO, M.S.L.; BARBOSA, D.F. Estudo comparativo da qualidade microbiológica de hambúrgueres processados artesanal e industrialmente. **Revista Ceres**, Viçosa, v.40, n.229, p.235-241, maio/jun., 1993.
29. COLE, M.B.; DAVIES, K.W; MUNRO, G.; HOLYOAK, C.D.; KILSBY, D.C. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Industrial Microbiology**, Basingstoke, v.12, n.3-5, p.232-239, Mar.-May, 1993.

30. COMI, G.; FRIGERIO, R.; CANTONI, C. *Listeria monocytogenes* serotypes in italian meat products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, n.4, p.168-171, Oct., 1992.
31. CORNFORTH, D.P. Raw meat and processing effects on color changes during ground beef patty cooking. In IFT ANNUAL MEETING. 1996, New Orleans. **Book of Abstracts**. Chicago: IFT, 1996. p.169.
32. CRAVEN, S.E.; BLANKENSHIP, L.C. Increased heat resistance of salmonellae in beef with added soy proteins. **Journal of Food Protection**, Ames, v.46, n.5, p.380-384, May, 1983.
33. CROSS, H.R.; BERRY, B.W.; WELLS, L.H. Effects of fat level and source on the chemical, sensory and cooking properties of ground beef patties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.45, n.4, Jul.-Aug., 1980.
34. CROSS, H.R.; STANFIELD, M.S.; GREEN, E.C.; HEINEMEYER, J.M.; HOLLICK, A.B. Effect of fat and textured soy protein content on consumer acceptance of ground beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, n.6, p.1331-1332, Nov.-Dec., 1975.
35. DALLMIER, A.W.; MARTIN, S.E. Catalase and superoxide dismutase activities after heat injury of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.2, p.581-582, Feb., 1988.

36. DAVIDSON, C.M.; WITTY, J.K. Fate of salmonellae in vacuum-packaged ground meat during storage and subsequent cooking. **Journal of the Canadian Institute of Food Science and Technology**, Ottawa, v.10, n.3, p.223-225, July, 1997.
37. DAVIS, C.E.; CYRUS, S. Evaluation of a rapid method for measurement of catalase activity in cooked beef and sausage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.2, p.253-256, Feb., 1998.
38. DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v.2, n.2, p.110-112, Apr., 1991.
39. DICKSON, J.S. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on beef tissue surfaces as affected by simulated processing conditions. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.10, n.3, p.165-174, Feb., 1990.
40. DOHERTY, A.M.; McMAHON, C.M.M.; SHERIDAN, J.J. Thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in meat and potato substrates. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.18, n.2, p.69-83, 1998.
41. DITSCHAEVER, C.L.; ARNOTT, D.R.; BULLOCK, D.H. Bacteriological quality of raw refrigerated ground beef. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.36, n.7, p.375-377, July, 1973.
42. DITSCHAEVER, C.L.; BULLOCK, D.H.; ARNOTT, D.R. Bacteriological evaluation of retail ground beef, frozen beef patties, and cooked hamburger. **Journal of Food Protection**, Ames, v.40, n.6, p.378-381, June, 1977.

43. EGBERT, W.R.; HUFFMAN, D.L.; CHEN, C-M.; DYLEWSKI, D.P.
Development of low-fat ground beef. **Food Technology**, Chicago, v.45,
n.6, p.64-73, June, 1991.
44. EL-KEST, S.E.; YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes*
during freezing and frozen storage. **Journal of Food Science**, Chicago,
v.56, n.4, p.1068-1071, July-Aug., 1991.
45. FAIN, A.R., Jr.; LINE, J.E.; MORAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.;
CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Listeria*
monocytogenes Scott A: D-value e z-value determinations in ground beef
and turkey. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.10, p.756-761,
Oct., 1991.
46. FALCÃO, D.P. Occurrence of *Yersina* spp. in foods in Brazil. **International**
Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.14, n.2, p.179-182, Nov.,
1991.
47. FARBER, J.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods.
International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.8, n.3, p.285-
291, June, 1989.
48. FARBER, J.M.; BROWN, B.E. Effect of prior heat shock on heat resistance of
Listeria monocytogenes in meat. **Applied and Environmental**
Microbiology, Washington, v.56, n.6, p.1584-1587, June, 1990.
49. FARBER, J.M.; DALEY, E. Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in
naturally-contaminated meats. **International Journal of Food**
Microbiology, Amsterdam, v.22, n.1, p.33-42, Apr., 1994.

50. FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v.55, n.3, p.476-511, Sept., 1991.
51. FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; JOHNSTON, M.A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.7, p.456-458, July, 1989.
52. FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; SPEIRS, J.I. Methodology for isolation of *Listeria* from foods - a canadian perspective. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p.675-678, May-June, 1988.
53. FENLON, D.R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.81, n.6, p.641-650, Dec., 1996.
54. FILPPI, J.A.; BANWART, G.J. Effect of the fat content of ground beef on the heat inactivation of poliovirus. **Journal of Food Science**, Chicago, v.39, n.5, p.865-868, Sept.-Oct., 1974.
55. FONTAINE, R.E.; ARNON, S.; MARTIN, W.T.; VERNON, T.M., Jr.; GANGAROSA, E.J.; FARMER, J.J., III; MORAN, A.B.; SILLIKER, J.H.; DECKER, D.L. Raw hamburger: an interstate common source of human salmonellosis. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.107, n.1, p.36-45, Jan., 1978.

56. FRANCO, B.D.G.M.; GUTH, B.E.C.; TRABULSI, L.R. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from foods in São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v.50, n.10, p.832-834, Oct., 1987.
57. FRASER, J.S. The enforcement of microbiological standards for foods: its effects on industry and food quality in New Zealand. **Food Technology in Australia**, Sydney, v.29, n.4, p.138-141, Apr., 1977.
58. GAZE, J.E.; BROWN, G.D.; GASKELL, D.E.; BANKS, J.G. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of chicken, beef steak and carrot. **Food Microbiology**, London, v.6, n.4, p.251-259, Dec., 1989.
59. GIANFRANCESCHI, M.; AURELI, P. Freezing and frozen storage on the survival of *Listeria monocytogenes* in different foods. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v.8, n.4, p.303-309, 1996.
60. GIESE, J. Developing low-fat meat products. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.4, p.100-108, Apr., 1992.
61. GILL, C.O.; McGINNIS, J.C.; RAHN, K.; HOUDE, A. The hygienic condition of manufacturing beef destined for the manufacture of hamburger patties. **Food Microbiology**, London, v.13, n.5, p.391-396, Oct., 1996.
62. GILL, C.O.; RAHN, K.; SLOAN, K.; McMULLEN, L.M. Assessment of the hygienic performances of hamburger patty production processes. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v.36, n.2-3, p.171-178, May, 1997.

63. GOEPFERT, J.M. Aerobic plate count and *Escherichia coli* determination on frozen ground-beef patties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.34, n.4, p.458-460, Oct., 1977.
64. GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. **Food Microbiology**, London, v.5, n.1, p.17-23, Mar., 1988.
65. GOODFELLOW, S.J.; BROWN, W.L. Fate of *Salmonella* inoculated into beef for cooking. **Journal of Food Protection**, Ames, v.41, n.8, p.598-605, Aug., 1978.
66. GRAU, F.H.; VANDERLINDE, P.B. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packaged beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.9, p.739-743, Sept., 1990.
67. HAGUE, M.A.; WARREN, K.E.; HUNT, M.C.; KROPF, D.H.; KASTNER, C.L.; STRODA, S.L.; JOHNSON, D.E. Endpoint temperature, internal cooked color, and expressible juice color relationships in ground beef patties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.3, p.465-470, May-June, 1994.
68. HANSEN, T.B.; KNOCHEL, S. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during rapid and slow heating in sous vide cooked beef. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.22, n.6, p.425-428, June, 1996.
69. HARMAYANI, E.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Fate of *Listeria monocytogenes* in raw and cooked ground beef with meat processing additives. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.18, n.3, p.223-232, May, 1993.

70. HARRISON, M.A.; CARPENTER, S.L. Survival of large populations of *Listeria monocytogenes* on chicken breasts processed using moist heat. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.6, p.376-378, June, 1989.
71. HEFNAWY, Y.A.; MOUSTAFA, S.I.; MARTH, E.H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in refrigerated and frozen ground beef and in sausage and broth with and without additives. **Lebensmittel Wissenschaft & Technologie**, London, v.26, n.2, p.167-170, Apr., 1993.
72. HUANG, I-P.D.; YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H.; MATTHEWS, M.E. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in chicken gravy. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.7, p.492-496, July, 1992.
73. IBRAHIM, A.; MAC RAE, I.C. Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. in red meat and milk samples in Brisbane, Australia. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, n.2-3, p.263-270, Feb., 1991.
74. IKEDIALA, J.N.; CORREIA, L.R.; FENTON, G.A.; BEM-ABDALLAH, N. Finite element modeling of heat transfer in meat patties during single-sided pan-frying. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.4, p.796-802, July-Aug., 1996.
75. INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Listeria monocytogenes*. In ICMSF. **Microorganisms in Foods. 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens**. London: Blackie Academic & Professional, 1996. p.141-182.

76. JACKSON, T.C.; HARDIN, M.D.; ACUFF, G.R. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.3, p.230-237, Mar., 1996.
77. JIANG, C. Temperature profiles during ground beef patty cooking. In: IFT ANNUAL MEETING. 1996, New Orleans. **Book of Abstracts**. Chicago: IFT, 1996. p.169.
78. JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, n.3, p.243-247, May, 1988.
79. JOHNSON, J.L.; DOYLE, M.P.; CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. A review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.1, p.81-91, Jan., 1990.
80. JORGENSEN, F.; STEPHENS, P.J.; KNOCH, S. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.274-281, Sept., 1995.
81. JUNEJA, V.K.; FOGLIA, T.A.; MARMER, B.S. Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: effect of pH, acidulant, and growth temperature. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.6, p.683-687, June, 1998.

82. JUNEJA, V.K.; SNYDER, O.P.Jr.; MARMER, B.S. Potential for growth from spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium botulinum* and vegetative cells of *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* serotypes in cooked ground beef during cooling. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.3, p.272-275, Mar., 1997a.
83. JUNEJA, V.K.; SNYDER, O.P.Jr.; WILLIAMS, A.C.; MARMER, B.S. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburger. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.10, p.1163-1166, Oct., 1997b.
84. KARCHES, H.; TEUFEL, P. *Listeria monocytogenes* - vorkommen in hackfleisch und verhalten in frischer zwiebelmettwurst. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.68, n.11, p.1388-1392, 1420, Nov., 1988.
85. KARIM, G. Bacteriological quality of raw and cooked hamburger at the retail level in Tehran. **Journal of Food Protection**, Ames, v.40, n.8, p.560-561, Aug., 1977.
86. KAYA, M.; SCHMIDT, U. Verhalten von *Listeria monocytogenes* im hackfleisch bei kühl - und gefrierlagerung. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.69, n.4, p.617-620, Apr., 1989.
87. KEETON, J.T. Low-fat meat products – technological problems with processing. **Meat Science**, Essex, v.36, n.1-2, p261-276, 1994.
88. KOTROLA, J.S.; CONNER, D.E.; MIKEL, W.B. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cooked turkey products. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.4, p.875-877,905, July-Aug., 1997.

89. KOTULA, A.W.; CHESNUT, C.M.; EMSWILER, B.S.; YOUNG, E.P.
Destruction of bacteria in beef patties by cooking. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.45, n.1, p.54-58, July, 1977.
90. LINE, J.E.; FAIN, A.R., Jr.; MORAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.; CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and z-value determinations in ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.10, p.762-766, Oct., 1991.
91. LINTON, R.H.; CARTER, W.H.; PIERSON, M.D.; HACKNEY, C.R. Use of a modified Gompertz equation to model nonlinear survival curves for *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.58, n.9, p.946-954, Sept., 1995.
92. LINTON, R.H.; CARTER, W.H.; PIERSON, M.D.; HACKNEY, C.R., EIFERT, J.D. Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.1, p.16-23, Jan., 1996.
93. LINTON, R.H.; PIERSON, M.D.; BISHOP, J.R. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.11, p.924-927, Nov., 1990.
94. LIU, M.N.; BERRY, B.W. Variability in color, cooking times, and internal temperature of beef patties under controlled cooking conditions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.9, p.969-975, Sept., 1996.

95. LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.5, p.465-471, May, 1996.
96. LUND, B.M.; KNOX, M.R.; COLE, M.B. Destruction of *Listeria monocytogenes* during microwave cooking. **Lancet**, London, v.1, n.8631, p.218, Jan., 1989.
97. MACKEY, B.M.; BRATCHELL, N. A review. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.9, n.3, p.89-94, Sept., 1989.
98. MACKEY, B.M.; PRITCHET, C.; NORRIS, A.; MEAD, G.C. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.10, n.6, p.251-255, June, 1990.
99. MCCARTHY, S.A. Pathogenicity of nonstressed, heat-stressed, and resuscitated *Listeria monocytogenes* 1A1 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.8, p.2389-2391, Aug., 1991.
100. McCLAIN, D.; LEE, W.E. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p.660-664, May-June, 1988.
101. MCNAMARA, A.M. Establishment of baseline data on the microbiota of meats. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.15, n.2, p.113-119, Sept., 1995.

102. MENDENHALL, V.T. Effect of pH and total pigment concentration on the internal color of cooked ground beef patties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.54, n.1, p.1-2, Jan.-Feb., 1989.
103. MERMELSTEIN, N.H. Controlling *E. coli* O157:H7 in meat. **Food Technology**, v.47, n.4, p.90-91, Apr., 1993.
104. MILES, C.A.; MACKEY, B.M. A mathematical analysis of microbial inactivation at linearly rising temperatures: calculation of the temperature rise needed to kill *Listeria monocytogenes* in different foods and methods for dynamic measurements of D and z values. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.77, n.1, p. 14-20, July, 1994.
105. MESQUITA, A.J. **Bactérias do gênero *Listeria* em carne e água residuária de lavagem de carcaça de um matadouro-frigorífico e em carne bovina moída comercializada na cidade de Goiânia, Goiás.** São Paulo, 1991. 144p. Tese (Doutor em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.
106. MOSSEL, D.A.A. *Listeria monocytogenes* in foods. Isolation, characterization and control. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.8, n.3, p.183-195, June, 1989.
107. OLLINGER-SNYDER, P.; EL-GAZZAR, F.; MATTHEWS, M.E.; MARTH, E.H.; UNKLESBAY, N. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork prepared with and without soy hulls. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.5, p.573-576, May, 1995.

108. ORTA-RAMIREZ, A.; PRICE, J.F.; HSU, Y-C.; VEERAMUTHU, G.J.; CHERRY MERRITT, J.S.; SMITH, D.M. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella senftenberg*, and enzymes with potential as time-temperature indicators in ground beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.5, p.471-475, May, 1997.
109. PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; SALA, F.J. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.8, p.3225-3232, Aug., 1997.
110. PAGÁN, R.; MANAS, P.; ALVAREZ, I.; SALA, F.J. Heat resistance in different heating media of *Listeria monocytogenes* ATCC15313 grown at different temperatures. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.18, n.3, p.205-219, Oct., 1998.
111. PALUMBO, S.A.; WILLIAMS, A.C. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. **Food Microbiology**, London, v.8, n.1, p.63-68, Mar., 1991.
112. PATEL, J.R.; BEUCHAT, L.R. Enrichment in Fraser broth supplemented with catalase or oxyrase[®], combined with the microcolony immunoblot technique, for detecting heat-injured *Listeria monocytogenes* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.26, n.2, p.165-176, July, 1995.

113. PIVNICK, H.; ERDMAN, I.E.; COLLINS-THOMPSON, D.; ROBERTS, G.; JOHNSTON, M.A.; CONLEY, D.R.; LACHAPELLE, G.; PURVIS, U.T.; FOSTER, R.; MILLING, M. Proposed microbiological standards for ground beef based on a canadian survey. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.39, n.6, p.408-412, June, 1976.
114. PFLUG, I.J. Evaluating a ground-beef patty cooking process using the general method of process calculation. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.10, p.1215-1223, Oct., 1997.
115. POETA, A.; POSSIDENTE, R.; GIACCONE, V. Indagine sull'inquinamento microbiologico di carni fresche e utensili in macelleria. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.32, n.321, p.1200-1205, dic., 1993.
116. QUINTAVALLA, S.; CAMPANINI, M. Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.12, n.5, p.184-187, May, 1991.
117. REIS, M.H.L.; VASCONCELOS, J.C.; TRABULSI, L.R. Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.39, n.1, p.270-271, Jan., 1980.
118. RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; McGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S. JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.308, n.12, p.681-685, Mar., 1983.

119. ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., ed. **Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers**. 1 ed. Washington, ASM Press, 1997. p.337-352.
120. ROSSI, O.D., Jr.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; NADER, A., F°. Análise bacteriológica de carnes de "hamburger" de fabricação industrial e caseira, comercializados em Jaboticabal/SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.37, n.3, p.265-279, Jun., 1985.
121. ROSSO, L.; BAJARD, S.; FLANDROIS, J.P.; LAHELLEC, C.; FOURNAUD, J.; VEIT, P. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.9, p.944-949, Sept., 1996.
122. RYAN, C.A.; TAUXE, R.V.; HOSEK, G.W.; WELLS, J.G.; STOEZ, P.A.; McFADDEN, H.W., Jr.; SMITH, P.W.; WRIGHT, G.F.; BLAKE, P.A. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.154, n.4, p.631-638, Oct., 1986.
123. RYSER, E.T. Inactivation of intracellular enzymes during sublethal thermal injury of *Listeria monocytogenes*. In: IFT ANNUAL MEETING. 1996, New Orleans. **Book of Abstracts**. Chicago:IFT, 1996. p.58
124. RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. 632p.

125. SAGE, J.R.; INGHAM, S.C. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing in ground beef patties. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.9, p.1181-1183, Sept., 1998.
126. SAIR, A.I.; BOOREN, A.M.; BERRY, B.W.; SMITH, D.M. Residual triose phosphate isomerase activity and color measurements to determine adequate cooking of ground beef patties. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62, n.2, p.156-161, Feb., 1999.
127. SCHOENI, J.L.; BRUNNER, K.; DOYLE, M.P. Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.5, p.334-337, May, 1991.
128. SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SNDA). Regula o emprego de soja texturizada. Portaria nº 115 de 25 jul. 1978. **Diário Oficial**, República Federativa do Brasil, Brasília, 01 ago. 1978.
129. SHELEF, L.A. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4 and 25°C. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.6, p.379-383, June, 1989.
130. SHERIDAN, J.J.; DUFFY, G.; McDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S. The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.22, n.2-3, p.105-113, May, 1994.
131. SINGH, R.P. Heat transfer in beef patties during cooking. In: IFT ANNUAL MEETING. 1996, New Orleans. **Book of Abstracts**. Chicago: IFT, 1996. p.168.

132. SKOVGAARD, N.; MORGEN, C.A. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, n.3, p.229-242, May, 1988.
133. SMITH, J.L. Stress-induced injury in *Listeria monocytogenes*. In: MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SOMKUTI, G.A., ed. **Foodborne Listeriosis**. New York: Elsevier Science Publishing, Inc., 1990. p.203-209.
134. SMITH, J.L.; BENEDICT, R.C.; PALUMBO, S.A. Protection against heat-injury in *Staphylococcus aureus* by solutes. **Journal of Food Protection**, Ames, v.45, n.1, p.54-58, Jan., 1982.
135. SMITH, J.L.; BUCHANAN, R.L. Identification of supplements that enhance the recovery of *Listeria monocytogenes* on modified Vogel Johnson agar. **Journal of Food Safety**, Westport, v.10, n.3, p.155-163, Feb., 1990.
136. SMITH, J.L.; HUNTER, S.E. Heat injury in *Listeria monocytogenes*: prevention by solutes. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v.21, n.5, p.307-311, Oct., 1988.
137. SNYDER, O.P., Jr. HACCP-An industry food safety self-control program - Part V. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.12, n.5, p.291-295, May, 1992a.
138. SNYDER, O.P., Jr. HACCP-An industry food safety self-control program - Part IX. Determining the thermal lethality of a process. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.12, n.10, p.628-630, Sept., 1992b.

139. SORQVIST, S. Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.76, n.4, p.383-388, Apr., 1994.
140. SPECK, M.L.; RAY, B. Effects of freezing and storage on microorganisms in frozen foods: a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v.40, n.5, p.333-336, May, 1977.
141. STEPHENS, P.J.; COLE, M.B.; JONES, M.V. Effect of heating rate on the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.77, n.6, p.702-708, Dec., 1994.
142. SULLIVAN, R.; MARNELL, R.M.; LARKIN, E.P.; READ, R.B., Jr. Inactivation of Poliovirus 1 and Coxsackievirus B-2 in broiled hamburgers. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.38, n.8, p.473-475, Aug., 1975.
143. SURKIEWICZ, B.F.; HARRIS, M.E.; ELLIOTT, R.P.; MACALUSO, J.F.; STRAND, M.M. Bacteriological survey of raw beef patties produced at establishments under federal inspection. **Applied Microbiology**, Washington, v.29, n.3, p.331-334, Mar., 1975.
144. TAMMINGA, S.K.; BEUMER, R.R.; KAMPELMACHER, E.H. Microbiological studies on hamburgers. **Journal of Hygiene**, London, v.88, n.1, p.125-142, Feb., 1982.
145. TORNER, M.J.; CASTILLO, M.; PLÁ, S.; HERNANDORENA, M.J. Estudio de la calidad sanitaria de productos cárnicos frescos elaborados en carnicerías-salchicherías del área de salud de Xátiva. **Alimentaria**, Madrid, v.33, n.262, p.27-31, mayo, 1995.

146. TROUTT, E.S.; HUNT, M.C.; JOHNSON, D.E.; CLAUS, J.R.; KASTNER, C.L.; KROPF, D.H. Characteristics of low-fat ground beef containing texture-modifying ingredients. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.1, p.19-24, Jan.-Feb., 1992a.
147. TROUTT, E.S.; HUNT, M.C.; JOHNSON, D.E.; CLAUS, J.R.; KASTNER, C.L.; KROPF, D.H.; STRODA, S. Chemical, physical, and sensory characterization of ground beef containing 5 to 30 percent fat. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.1, p.25-29, Jan.-Feb., 1992b.
148. TRUSCOTT, R.B; MCNAB, W.B. Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, n.8, p.626-628, 638, Aug., 1988.
149. TUNCAN, E.U.; MARTIN, S.E. Combined effects of salts and temperature on the thermal destruction of *Staphylococcus aureus* MF-31. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.3, p.833-836, May-June, 1990.
150. UNISCIENCE NEWS NET. **Researcher's database limits death toll.**
<http://unisci.com/stories/19991/0204993.htm> 17 mar. 1999.
151. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Food Safety Education na Communication Staff. **USDA advises consumers to use a thermometer when cooking hamburger.** <http://www.usda.gov/agency/fsis/thermopr.htm> 04 sept. 1997.

152. UNITED STATES NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON
MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS (USNACMCF).
Recomendations of the US National Advisory Committee on
Microbiologica Criteria for Foods: I HACCP principles, II meat and poultry,
III seafood. **Food Control**, Oxford, v.2, n.4, p.202-211, Oct., 1991.
153. VAN LAACK, R.L.J.M; BERRY, B.W.; SOLOMON, M.B. Effect of precooking
conditions on color of cooked beef patties. **Journal of Food Protection**,
Des Moines, v.59, n.9, p.976-983, Sept., 1996a.
154. VAN LAACK, R.L.J.M; BERRY, B.W.; SOLOMON, M.B. Variations in internal
color of cooked beef patties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61,
n.2, p.410-414, Mar.-Apr., 1996b.
155. WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M; POWELL, C.; TIWARI, N.P.; READ, S.;
PLANTE, R.; BABIUK, T.; LAFFEY, P.; KAURI, T.; MAYERS, P.;
CHAMPAGNE, M.J.; HUNT, T.; LACASSE, P.; VIET, K.; SMANDO, R.;
COATES, F. Comparison of methods for optimum detection of stressed
and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, London,
v.9, n.2, p.127-145, June, 1992.
156. WARREN, K.E.; HUNT, M.C.; KROPF, D.H. Myoglobin oxidative state affects
internal cooked color development in ground beef patties. **Journal of
Food Science**, Chicago, v.61, n.3, p.513-515,519, May-June, 1996.
157. YEN, L.C.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Effect of meat curing ingredients
on thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork. **Journal
of Food Protection**, Ames, v.54, n.6, p.408-412, June, 1991.

158. YEN, L.C.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork with water, sodium chloride and other curing ingredients. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v.25, n.1, p.61-65, Feb., 1992a.
159. YEN, L.C.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Destruction of *Listeria monocytogenes* by heat in ground pork formulated with kappa-carrageenan, sodium lactate and the algin/calcium meat binder. **Food Microbiology**, London, n.9, n.3, p.223-230, Sept., 1992b.
160. ZAIKA, L.L.; PALUMBO, S.A.; SMITH, J.L.; DEL CORRAL, F.; BHADURI, S.; JONES, C.O.; KIM, A.H. Destruction of *Listeria monocytogenes* during frankfurter processing. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.1, p.18-21, Jan., 1990.

CAPÍTULO 2

RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Listeria monocytogenes* EM FORMULAÇÕES PARA HAMBÚRGUER: INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA EMPREGADO PARA CONTAGEM DA POPULAÇÃO SOBREVIVENTE

RESUMO

Neste trabalho investigou-se a influência do meio de cultura utilizado na recuperação da população sobrevivente sobre os valores *D* para *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino. Partindo-se de carne submetida a tratamento para redução da microbiota contaminante (a camada externa da carne foi removida após imersão em água fervente por 2 min), foram preparadas quatro formulações de hambúrguer: 10% de gordura (F1), 20% de gordura (F2), 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio (F3) e 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada (F4), inoculadas com uma suspensão contendo uma mistura de 5 cepas de *L. monocytogenes*. A determinação da resistência térmica foi realizada em tubo "TDT" fechado com tampa de borracha, em banho de água à temperatura de 55,0, 60,0 e 65,0°C. A contagem da população sobrevivente foi efetuada empregando-se ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (TPAP) e ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM), com confirmação da colônia através da técnica de iluminação a 45°. Partindo-se da contagem em TPAP, os valores *D* obtidos por regressão linear para F1, F2, F3 e F4 a 55,0°C foram 36,11, 39,93, 62,76 e 37,97 min, respectivamente. A 60,0°C os valores *D* foram 2,86, 2,55, 4,32 e 3,24 min, enquanto que a 65,0°C valores iguais a 0,34, 0,34, 0,52 e 0,36 min foram obtidos. Os valores *D* calculados a partir da contagem em LPM para F1, F2, F3 e F4 a 55,0°C foram 23,05, 23,46, 38,54 e 23,93 min, respectivamente. A 60,0°C os

valores *D* foram 2,09, 1,81, 3,06 e 2,02 min, enquanto que a 65,0°C valores iguais a 0,27, 0,25, 0,37 e 0,29 min foram obtidos. Os valores *z* encontrados foram 4,93, 4,83, 4,81 e 4,95°C com TPAP e 5,18, 5,08, 4,95 e 5,21°C com LPM, para F1, F2, F3 e F4, respectivamente. Os resultados mostraram que a resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino foi subestimada até 1,6-1,7 vezes quando o meio LPM foi utilizado para contagem da população sobrevivente.

**THERMAL RESISTANCE OF *Listeria monocytogenes* IN FORMULATIONS
FOR HAMBURGER: INFLUENCE OF THE PLATING MEDIUM
EMPLOYED ON THE ENUMERATION OF SURVIVING CELLS**

SUMMARY

The influence of the plating medium used for the recovery of survivors, on the *D*-values for *L. monocytogenes*, in formulations for beef hamburger was investigated. Four formulations: 10% fat (F1), 20% fat (F2), 10% fat and 1.5% sodium chloride (F3) and 10% fat and 10.5% hydrated texturized soy protein (F4) were prepared, using meat treated to reduce the background microflora (the outer surface of the beef was removed after immersion in boiling water for 2 min). Each sample was inoculated with a mixture of five strains of *L. monocytogenes*. Heat resistance was determined in rubber capped TDT tubes submerged in water baths at 55.0, 60.0 and 65.0°C. Survival was determined by enumeration on tryptose phosphate agar containing 1% sodium pyruvate (TPAP) and on lithium chloride phenylethanol moxalactam medium (LPM). Colonies were confirmed by using an illuminator at an angle of 45 degrees. *D*-values were calculated by linear regression, giving values on TPAP at 55.0°C of 36.11, 39.93, 62.76 and 37.97 min for F1, F2, F3 and F4 respectively. At 60.0°C the *D*-values were 2.86, 2.55, 4.32 and 3.24 min and at 65.0°C they were 0.34, 0.34, 0.52 and 0.36 min. The *D*-values for enumeration on LPM for F1, F2, F3 and F4 at 55.0°C were 23.05, 23.46, 38.54 and 23.93 min, respectively. At 60.0°C these values were 2.09, 1.81, 3.06 and 2.02 min and at 65.0°C they were 0.27, 0.25, 0.37 and 0.29 min. The *z*-values for F1, F2, F3 and F4 using the TPAP recovery data were 4.93, 4.83, 4.81 and 4.95°C, respectively. The *z*-values obtained using the LPM recovery data were 5.18, 5.08, 4.95 and 5.21°C. The results showed that the heat resistance of *L. monocytogenes* in formulations for beef hamburger can be underestimated when LPM is used as the recovery medium.

1. INTRODUÇÃO

Os meios de cultura normalmente utilizados para detecção e contagem de *Listeria* spp. contêm antibióticos e vários agentes seletivos que visam inibir o crescimento de outros tipos de microrganismos presentes no alimento. Entretanto, tem-se demonstrado que nenhum dos agentes seletivos utilizados é completamente inócuo, podendo inibir o crescimento da própria bactéria que se deseja detectar. Esta inibição é mais evidente quando o microrganismo é submetido a algum tipo de injúria, como a promovida pelo calor [23].

Quando se submete *Listeria monocytogenes* a condições adversas de natureza física ou química a níveis subletais, as células podem ser injuriadas estrutural e fisiologicamente, resultando, inclusive, em aumento da sensibilidade aos agentes inibidores presentes no meio, o que impede sua recuperação e subsequente crescimento. Entretanto, quando inoculadas em meios não seletivos, nutricionalmente ricos, as células injuriadas podem se recuperar e crescer, tornando possível sua detecção e quantificação [18, 23,28].

O ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM) é um dos meios de cultura mais utilizados e é considerado bastante eficiente para a detecção e contagem de *L. monocytogenes* em alimentos, inclusive produtos cárneos [4, 28,29]. Entretanto, segundo BUCHANAN et al. [4], sua composição não permite o crescimento de células injuriadas pelo calor.

Em trabalhos realizados para determinar a resistência térmica de *L. monocytogenes* em meio de cultura, pode ser observada a utilização de meios não seletivos para contagem dos sobreviventes [10, 14, 15, 20]. Entretanto, tem sido demonstrado que esta bactéria é mais resistente ao calor em carne do que em meio de cultura, o que é atribuído a diferenças na composição do substrato de aquecimento [3, 13, 22]. Além disso, o aquecimento em caldo não reproduz a verdadeira condição existente no tratamento térmico do alimento.

Em estudos de determinação da resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina moída, pesquisadores têm submetido a carne a um tratamento térmico preliminar para reduzir a microbiota contaminante, possibilitando, assim, a recuperação das células em meios sólidos não seletivos [9, 11, 13, 24].

O presente estudo objetivou avaliar a influência do meio de cultura empregado na contagem da população sobrevivente na resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino, utilizando carne previamente submetida a tratamento para redução da microbiota contaminante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo dos Ingredientes

2.1.1 Carne

Peças de acém (corte dianteiro de bovino), adquiridas no comércio varejista de Campinas-SP, foram imersas em água fervente durante 2 min. Em seguida, a camada externa foi removida assepticamente e descartada. As porções de carne com maior quantidade de tecido adiposo foram separadas das porções magras e moídas separadamente, a fim de serem utilizadas no ajuste do teor de gordura das formulações. A trituração da carne foi realizada empregando-se moedor (Electrolux) provido de disco com furos de 4 mm de diâmetro. As partes removíveis do moedor foram esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 min. Após a retirada de amostras para determinação dos teores de umidade e gordura, contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e detecção e contagem de *L. monocytogenes*, as porções de carne moída foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -18°C. O procedimento utilizado no preparo da carne foi similar ao descrito por SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [24].

2.1.2 Proteína Texturizada de Soja (PTS)

A proteína texturizada de soja (Santista Alimentos) foi armazenada em recipiente estéril hermético, após remoção de amostra para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e detecção e contagem de *L. monocytogenes*.

2.2 Preparo das Formulações para Hambúrguer

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de carne foram misturadas em ambiente asséptico, preparando-se quatro formulações: carne com 10% de gordura (F1), carne com 20% de gordura (F2), carne com 10% de gordura e 1,5% de NaCl (F3) e carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada (F4). Antes de ser adicionada à carne, a proteína texturizada de soja (PTS) foi hidratada na proporção de 2:1 (água:PTS), através de imersão em água estéril a 60°C durante 20 min.

Após mistura dos ingredientes e trituração das formulações, efetuou-se a remoção de amostras para determinação do pH, atividade de água (A_w), composição centesimal e contagem de microrganismos aeróbios mesófilos. As formulações de hambúrguer (100g) foram, então, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e armazenadas a -18°C.

2.3 Avaliação Físico-Química e Microbiológica dos Ingredientes e das Formulações

2.3.1 Análises Físico-Químicas

Para a determinação de umidade, proteínas e cinzas foram utilizados os métodos descritos, respectivamente, nas seções 24.002, 24.027 e 24.009 da

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC [1], e para a gordura empregou-se o método de BLIGH & DYER [2]. A determinação do pH seguiu a metodologia descrita por SEBRANEK (citado por SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [24]), empregando-se potenciômetro (B374, Micronal) previamente calibrado. A A_g foi avaliada utilizando-se higrômetro elétrico (AquaLab, Decagon).

2.3.2 Análises Microbiológicas

Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos: Foi realizada utilizando-se a técnica de inoculação em profundidade e o meio ágar padrão para contagem (PCA, Oxoid), com incubação das placas a 35°C/48h, conforme recomendado por SWANSON et al. [26].

Deteção e contagem de *L. monocytogenes*: As amostras foram analisadas através de contagem direta em placas e através de enriquecimento seletivo.

Porções de 25 g de amostra foram maceradas em homogeneizador de pistões (mod.400, Stomacher), com 225 ml de caldo de enriquecimento para *Listeria* desenvolvido por McCLAIN & LEE [17] (LEB, Oxoid), sem acriflavina, durante 2 min. Aliquotas de 1 ml (subdivididas em 0,3 + 0,3 + 0,3 + 0,1 ml) foram inoculadas superficialmente em placas contendo ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM, Difco), com incubação a 30°C/48h. A contagem de colônias típicas de *Listeria* foi realizada com o auxílio da iluminação a 45°, empregando-se iluminador (KL1500, Schott), espelho côncavo e microscópio estereoscópico (4752, Karl Zeiss).

A detecção da presença de *L. monocytogenes* através de enriquecimento seletivo, após adição de acriflavina (Sigma) à amostra remanescente e homogeneização durante 2 min, seguiu a metodologia recomendada por

WARBURTON, FARBER, BABIUK [27], utilizando-se LPM (Difco) e ágar Oxford (Oxoid) modificado (MOX) para plaqueamento.

2.4 Determinação do Tempo “Lag” de Aquecimento

O tempo “lag” de aquecimento foi determinado a 55,0, 60,0 e 65,0°C. Dois gramas de carne foram acondicionados em tubos TDT (ϕ externo=8 mm e comprimento=105 mm) e inseriu-se um termopar de cobre-constantan (tipo T) (TT-T-36, Omega Engineering, Inc.), de forma que a junta de medida ficasse no centro geométrico da amostra. Em seguida, o tubo foi imerso em banho de gelo. Quando a temperatura da carne atingiu 5-6°C, o tubo foi transferido para um banho termostático (H-12105-10, Cole Parmer, precisão de $\pm 0,25^\circ\text{C}$) contendo água e ajustado à temperatura desejada, acionando-se no mesmo instante o cronômetro. Quando a carne atingiu a temperatura do banho, registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo “lag” de aquecimento). A temperatura da amostra durante o aquecimento foi monitorada através do termopar conectado a um registrador de temperatura (H-92800-10, Cole Parmer), previamente programado para registrar a temperatura a cada intervalo de 5 s. Este procedimento foi repetido 10 vezes para cada temperatura, por tipo de formulação. Os instrumentos de medida de temperatura foram aferidos com termômetros de bulbo de mercúrio (ASTM-USA), calibrados com padrões NIST (“National Institute of Standards and Technology”).

2.5 Preparo do Inóculo

Foi utilizada como inóculo uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* (*L.m.*): Scott A (sorovar 4b) e quatro cepas isoladas de carne bovina moída *L.m.* 259 (4b), *L.m.* 357 (1/2a), *L.m.* 374 (1/2a) e *L.m.* 410 (1/2a).

Todas as cepas, avaliadas conforme recomendado por LOVETT & HITCHINS [16], apresentaram patogenicidade positiva em testes com camundongos. As culturas-estoque, mantidas a 4°C em tubos com ágar tripticase soja (Oxoid) inclinado contendo 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSA-YE), foram repicadas mensalmente a fim de manter a viabilidade das células.

As culturas foram ativadas mediante três transferências consecutivas para caldo tripticase soja (Oxoid) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSB-YE), a fim de se obter células na fase estacionária de crescimento. Após incubação a 35°C durante 15 horas, as suspensões foram centrifugadas (J2-21, Beckman) a 5.500 x *g* a 4°C durante 15 min e lavadas duas vezes com tampão Butterfield. Em seguida, o sedimento final foi suspenso no mesmo diluente, de forma a se obter uma concentração de cerca de 10¹⁰ UFC/ml, conforme determinado em experimentos preliminares. Volumes iguais de cada cultura foram então misturados, efetuando-se a contagem através de inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato (TPA) (TPB, Difco; 2% de ágar, Merck) e incubação a 35°C/48h. A mistura assim preparada foi imediatamente inoculada nas formulações.

2.6 Inoculação e Acondicionamento das Formulações nos Tubos TDT

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de 100 g de carne foram inoculadas com a mistura de culturas numa proporção de 1% (v/p), seguindo-se uma homogeneização manual e, depois, em homogeneizador de pistões, durante 1 min. Em ambiente asséptico, e com a carne inoculada mantida em banho de gelo, foi efetuado o acondicionamento de 2 g nos tubos TDT (ϕ externo=8 mm e comprimento=105 mm), procedendo-se, no final, a uma limpeza cuidadosa da parede interna dos tubos com “swab” estéril. Em seguida, os tubos foram fechados com tampa de borracha e armazenados a 4°C/18 h.

Resultados obtidos em testes preliminares demonstraram que o tempo de armazenamento das amostras até o tratamento térmico não teve influência na resistência térmica da bactéria.

2.7 Tratamento Térmico e Contagem de *L. monocytogenes*

Os tubos foram imersos em banho termostático (H-12105-10, Cole Parmer, precisão de $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$) ajustado à temperatura de 55,0, 60,0 ou 65,0°C, de forma que o nível da água ficasse 2 cm acima do nível da carne.

Quando a amostra atingiu a temperatura do banho (ao final do tempo “lag” de aquecimento), dois tubos foram imediatamente removidos e resfriados em banho de gelo. A partir desse ponto, dois tubos foram removidos a cada um dos seguintes intervalos de tempo:

55,0°C: 20, 40, 60, 80 e 100 min

60,0°C: 2, 4, 6, 8 e 10 min

65,0°C: 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 min

No tratamento térmico a 55,0°C, para a formulação F3, também foram removidos dois tubos após 120 min. Nos experimentos a 65,0°C, adicionalmente, foram retiradas amostras durante o tempo “lag” de aquecimento (dois tubos após 1,0 e 1,5 min, contados a partir da imersão no banho).

Os experimentos foram replicados duas vezes para cada temperatura, por tipo de formulação.

Após resfriamento em banho de gelo, a carne foi transferida para saco plástico estéril, procedendo-se a lavagem do tubo duas vezes com 1,5 ml de tampão Butterfield. O volume de diluente foi então completado para 18 ml, efetuando-se a homogeneização da amostra durante 2 min em homogeneizador de pistões. Em seguida, foram preparadas diluições sucessivas no mesmo

diluyente, com inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (TPAP) (TPB, Difco; 2% de ágar, Merck, piruvato de sódio, Merck) e em LPM (Difco), seguido de incubação a 35 e 30°C durante 72 h, respectivamente. Todas as colônias típicas, observadas através de iluminação a 45°, foram consideradas unidades de *L. monocytogenes*. O mesmo método foi utilizado para avaliação da carne contida em dois tubos que não sofreram tratamento térmico.

2.8 Determinação dos Valores D e z

A duração do tratamento térmico empregado foi corrigido para considerar o efeito do tempo “lag”, calculando-se o tempo de aquecimento equivalente à temperatura de referência (temperatura do banho). Nos experimentos realizados a 65,0°C, os intervalos de tempo decorrentes da remoção de amostras durante o tempo “lag” também foram considerados para o cálculo do tempo de aquecimento à temperatura de referência.

Utilizando-se os dados de temperatura registrados durante o tempo “lag” de aquecimento foi possível calcular as taxas letais, empregando-se a fórmula do método geral [25]:

$$L=10^{(T-T_R)/z}$$

onde L é a taxa letal, T é a temperatura da amostra durante o aquecimento (°C), T_R é a temperatura de referência (temperatura do banho) (°C) e os valores z iniciais considerados foram 5,25°C e 5,72°C, para os dados obtidos, respectivamente, em TPAP e LPM [médias dos valores obtidos através de regressão linear das curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D$ x temperatura), considerando-se a contagem obtida no tempo “lag” como contagem no tempo “zero” de aquecimento]. O tempo de aquecimento à temperatura do banho foi então calculado empregando-se o método de PATASHNIK [21].

Esses tempos corrigidos foram usados na determinação dos valores D , obtidos por regressão linear das curvas de sobrevivência ($\log_{10}$ do número de sobreviventes x tempo de aquecimento). As curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D$ x temperatura) foram então traçadas, obtendo-se os valores z através de regressão linear. Como a taxa letal é função do valor z , todo o cálculo foi repetido até que os valores z calculados e os valores z iniciais fossem rigorosamente iguais.

2.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), complementando-se a análise com o teste de Duncan para comparação de médias. Em todos os testes foi considerado um nível de 5% de significância. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação Microbiológica dos Ingredientes

A contagem obtida para microrganismos aeróbios mesófilos foi de $3,00 \times 10^3$ e $6,10 \times 10^4$ UFC/g para as porções de carne com baixo e alto teor de gordura, respectivamente. Para a PTS, obteve-se uma contagem de $2,58 \times 10^2$ UFC/g. Na análise para detecção e contagem de *L. monocytogenes* nos ingredientes não foi observada nenhuma colônia típica.

3.2 Avaliação Físico-Química e Microbiológica das Formulações

Na *Tabela 1* são apresentados os resultados obtidos na análise físico-química das formulações. Pode-se observar que a adição de PTS à carne (F4) resultou em pequeno aumento do valor de pH, enquanto a adição de NaCl (F3) promoveu redução da A_a . Além disso, pode ser verificado que os resultados obtidos para lipídeos estão próximos dos teores pré-definidos.

TABELA 1. Características físico-químicas das formulações de hambúrguer^a

	Formulações ^b			
	F1	F2	F3	F4
pH	5,72	5,72	5,69	5,89
A_a	0,990	0,990	0,981	0,990
Umidade (%)	70,71	62,13	68,90	69,54
Proteínas (%)	18,50	16,96	19,08	19,38
Lipídeos (%)	10,38	20,46	10,49	9,77
Cinzas (%)	0,89	0,84	2,22	1,04

a: valor médio de 3 amostras

b: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos nas formulações foi de $1,05 \times 10^4$, $9,50 \times 10^3$, $3,40 \times 10^4$ e $1,90 \times 10^4$ UFC/g para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, indicando que a manipulação e o processo de trituração das formulações não contribuiu para o aumento da contaminação, considerando-se as contagens iniciais do principal ingrediente, a carne.

3.3 Determinação dos Valores D e z

O procedimento utilizado para redução da contaminação da carne fresca permitiu que a população de *L. monocytogenes* inoculada superasse a população

dos contaminantes em pelo menos três ciclos logarítmicos, e possibilitou a contagem da bactéria em TPAP, meio não seletivo que promove a recuperação de células injuriadas pelo calor, sem comprometer a obtenção dos resultados.

As contagens obtidas para *L. monocytogenes* nas amostras que não sofreram tratamento térmico são mostradas na Tabela 2. Observa-se que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os dois meios de cultura (TPAP e LPM) na contagem do inóculo inicial. Os desvios-padrão entre as amostras foram inferiores a 0,27 ciclos logarítmicos.

TABELA 2. Contagem de *L. monocytogenes* nas formulações de hambúrguer que não sofreram tratamento térmico

Temperatura ^a (°C)	Repl. ^b	Log ₁₀ UFC/g ^c							
		Form. F1 ^d		Form. F2		Form. F3		Form. F4	
		TPAP ^e	LPM ^e	TPAP	LPM	TPAP	LPM	TPAP	LPM
55,0	1	7,74	7,75	7,74	7,84	7,85	7,81	7,88	7,95
	2	7,70	7,71	7,65	7,63	7,84	7,85	7,96	7,93
60,0	1	7,49	7,59	7,59	7,63	7,53	7,55	7,88	7,87
	2	7,77	7,84	7,67	7,69	7,74	7,66	8,07	8,12
65,0	1	7,71	7,75	7,77	7,75	7,75	7,81	8,00	7,98
	2	7,89	7,86	7,72	7,75	7,78	7,84	8,02	7,97

a: temperatura do tratamento térmico subsequente

b: replicatas 1 e 2

c: valor médio de 2 amostras. Para cada formulação, não existe diferença significativa ($P>0,05$) entre os valores médios na mesma linha

d: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

e: TPAP: ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio

LPM: ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam

No trabalho realizado por FAIN et al. [9] também foi observado que não havia diferença significativa na contagem de *L. monocytogenes* nas amostras de

carne que não sofreram aquecimento, quando comparados os resultados obtidos em LPM e em ágar Columbia contendo 1% de piruvato de sódio.

Os resultados obtidos por BUCHANAN et al. [4] demonstraram que o LPM, assim como outros meios seletivos utilizados para *Listeria*, promove uma recuperação quantitativa equivalente à do TPAP, quando consideradas células não injuriadas pelo calor.

Na Tabela 3 são apresentados os valores *D* e *z* para *L. monocytogenes* obtidos a partir da contagem dos sobreviventes em TPAP e LPM.

TABELA 3. Valores *D* e *z* para *L. monocytogenes*, inoculada em formulações de hambúrguer, obtidos a partir da contagem dos sobreviventes em TPAP e LPM

Temperatura (°C)	Meios ^a	Valor <i>D</i> (min) ^b			
		Form. F1 ^c	Form. F2	Form. F3	Form. F4
55,0	TPAP	36,11 (0,74) ^d A	39,93 (0,56) A	62,76 (1,46) A	37,97 (1,33) A
	LPM	23,05 (0,15) B	23,46 (0,74) B	38,54 (0,52) B	23,93 (0,32) B
60,0	TPAP	2,86 (0,13) A	2,55 (0,19) A	4,32 (0,08) A	3,24 (0,05) A
	LPM	2,09 (0,23) A	1,81 (0,12) A	3,06 (0,01) B	2,02 (0,04) B
65,0	TPAP	0,34 (0,01) A	0,34 (0,01) A	0,52 (0,01) A	0,36 (0,01) A
	LPM	0,27 (0,00) A	0,25 (0,00) A	0,37 (0,01) A	0,29 (0,01) A
valor <i>z</i>	TPAP	4,93°C	4,83°C	4,81°C	4,95°C
	LPM	5,18°C	5,08°C	4,95°C	5,21°C

a: TPAP: ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio
LPM: ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam

b: valor médio de 2 repetições

c: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

d: desvio padrão entre parênteses

A,B: para cada temperatura de aquecimento, valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Observa-se que os valores D obtidos através da contagem em TPAP foram maiores do que em LPM em todas as temperaturas testadas, independente da formulação. A análise de regressão linear empregada para avaliação das curvas de sobrevivência resultaram em valores R^2 superiores a 0,94 e 0,92, quando foram considerados os dados obtidos, respectivamente, em TPAP e LPM.

SMITH & ARCHER (citados por BUCHANAN et al. [4]) e BUSH & DONELLY [5] demonstraram que a adição de piruvato de sódio ao meio de cultura não seletivo aumentava a recuperação de *L. monocytogenes* injuriada pelo calor. Entretanto, devido à presença de substâncias inibidoras, o LPM, assim como outros meios utilizados para detecção e contagem de *Listeria* sp., impede a recuperação e subsequente formação de colônias por células submetidas a este tipo de estresse [4,28].

Assim sendo, os valores D mais elevados obtidos neste trabalho são atribuídos à ausência de agentes seletivos no meio TPAP, e à sua capacidade de aumentar a recuperação das células injuriadas pelo calor, o que resultou na quantificação de um maior número de células viáveis.

SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [24] e FAIN et al. [9], avaliando a resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina moída, também verificaram que a utilização de meios não seletivos, adicionados ou não de piruvato de sódio, resultou na obtenção de valores D superiores aos encontrados com LPM. Resultado similar foi obtido por HARRISON & HUANG [12] em carne de caranguejo, comparando os meios ágar tripticase soja e Vogel-Johnson modificado.

Outros autores também observaram a influência do meio empregado para contagem dos sobreviventes no valor D para *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157:H7 e *Yersinia enterocolitica* submetidas a aquecimento em meio de cultura e carne bovina moída [6, 7, 8, 14, 15].

Analisando-se os dados apresentados na *Tabela 3*, pode ser observado que o efeito do meio de plaqueamento foi mais evidente a 55,0°C, quando os valores *D* encontrados com TPAP foram 1,6 a 1,7 vezes superiores àqueles obtidos com LPM, e diminuiu com o aumento da temperatura. A 60,0°C os valores *D* determinados com TPAP foram 1,4 a 1,6 vezes mais elevados, enquanto que a 65,0°C não foi observada diferença significativa entre os dois meios ($P < 0,05$).

FAIN et al. [9] também observaram um maior efeito do meio de cultura nos valores *D* determinados a 51,7 do que a 62,8°C. Os valores $D_{51,7^{\circ}\text{C}}$ obtidos com ágar Columbia adicionado de piruvato foram quase duas vezes maiores que os valores encontrados com LPM, enquanto que a 62,8°C este aumento variou entre 1,1 e 1,2 vezes. Resultado similar foi obtido por CLAVERO, BEUCHAT, DOYLE [6] ao submeter *E. coli* O157:H7 a aquecimento entre 54,4 e 68,3°C. Entretanto, os resultados obtidos por HARRISON & HUANG [12] e LINTON, PIERSON, BISHOP [14] não confirmaram este maior efeito do meio quando são utilizadas temperaturas de aquecimento mais baixas.

Segundo GOLDEN, BEUCHAT, BRACKETT [10] e EL-SHENAWY, YOUSEF, MARTH (citados por OLLINGER-SNYDER et al. [19]), uma maior parcela da população de *L. monocytogenes* encontra-se em condição de injúria subletal a temperaturas de aquecimento mais baixas do que a temperaturas mais elevadas. Assim, o efeito mais intenso do meio de plaqueamento a 55,0°C observado neste trabalho, pode estar relacionado com o fato de existir uma maior população injuriada a esta temperatura, o que evidenciou a diferença entre os meios quanto à capacidade de recuperação dos sobreviventes.

Os resultados apresentados na *Tabela 3* mostram que, embora os valores *z* obtidos com LPM sejam maiores do que com TPAP, a diferença (0,14 a 0,26°C) entre os dois meios não é significativa. Nos trabalhos citados na literatura, podem

ser observadas diferenças entre valores z variando de 0 a 1,41°C, quando comparados meios seletivos e não seletivos.

4. CONCLUSÕES

O procedimento utilizado para redução da contaminação inicial da carne mostrou ser eficiente, e possibilitou a contagem de *L. monocytogenes* em TPAP, meio de cultura não seletivo que permite a recuperação de células injuriadas pelo calor, sem interferência significativa da microbiota contaminante.

O meio de cultura empregado na contagem da população sobrevivente teve influência nos valores D obtidos para *L. monocytogenes* submetida a aquecimento em formulações para hambúrguer, principalmente a 55°C. A esta temperatura, os valores D obtidos através da contagem em TPAP foram 1,6-1,7 vezes maiores que os encontrados com LPM, o que demonstra que a resistência térmica da bactéria é subestimada quando LPM é utilizado para contagem dos sobreviventes.

Em termos práticos, num tratamento térmico a 55,0°C, temperatura geralmente utilizada no processo “sous vide”, se forem considerados os valores D obtidos através da contagem em LPM, o tempo de processo definido como seguro pode vir a ser estabelecido em valores até 1,6-1,7 vezes menores do que seria necessário para garantir a qualidade higiênico-sanitária do produto final.

Os resultados obtidos neste trabalho enfatizam, portanto, a importância da escolha de um meio de cultura adequado para os estudos de resistência térmica de *L. monocytogenes* e, possivelmente, de outros microrganismos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14 ed. Arlington, 1984. 1141p.
- [2] BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
- [3] BOYLE, D.L.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and in ground beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v.55, n.2, p.327-329, Mar.-Apr., 1990.
- [4] BUCHANAN, R.L.; SMITH, J.L.; STAHL, H.G.; ARCHER, D.L. *Listeria* methods development research at the eastern regional research center, U.S. Department of Agriculture. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p.651-654, May-June, 1988.
- [5] BUSCH, S.V.; DONNELLY, C.W. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, n.1, p.14-20, Jan., 1992.
- [6] CLAVERO, M.R.S; BEUCHAT, L.R.; DOYLE, M.P. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ground beef and bovine feces, and suitability of media for enumeration. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.3, p.285-289, Mar., 1998.
- [7] CRAVEN, S.E.; BLANKENSHIP, L.C. Increased heat resistance of salmonellae in beef with added soy proteins. **Journal of Food Protection**, Ames, v.46, n.5, p.380-384, May, 1983.

- [8] DOHERTY, A.M.; McMAHON, C.M.M.; SHERIDAN, J.J. Thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* in meat and potato substrates. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.18, n.2, p.69-83, 1998.
- [9] FAIN, A.R., Jr.; LINE, J.E.; MORAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.; CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value e z-value determinations in ground beef and turkey. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.10, p.756-761, oct., 1991.
- [10] GOLDEN, D.A.; BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. **Food Microbiology**, London, v.5, n.1, p.17-23, Mar., 1988.
- [11] HANSEN, T.B.; KNOCHEL, S. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during rapid and slow heating in sous vide cooked beef. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.22, n.6, p.425-428, June, 1996.
- [12] HARRISON, M.A.; HUANG, Y.W. Thermal death times for *Listeria monocytogenes* (Scott A) in crabmeat. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.10, p.878-880, Oct., 1990.
- [13] JORGENSEN, F.; STEPHENS, P.J.; KNOCHEL, S. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.274-281, Sept., 1995.
- [14] LINTON, R.H.; PIERSON, M.D.; BISHOP, J.R. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.11, p.924-927, Nov., 1990.

- [15] LINTON, R.H.; WEBSTER, J.B; PIERSON, M.D.; BISHOP, J.R.; HACKNEY, C.R. The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, Ames, v.55, n.2, Feb., p.84-87, 1992.
- [16] LOVETT, J.; HITCHINS, A.D. *Listeria* isolation. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 6 ed. (Suppl.) 2nd printing (2/89). Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1989. Chap. 29, p.29.01-29.14.
- [17] McCLAIN, D.; LEE, W.H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p.660-664, May-June, 1988.
- [18] MOSSEL, D.A.A. *Listeria monocytogenes* in foods. Isolation, characterization and control. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.8, n.3, p.183-195, June, 1989.
- [19] OLLINGER-SNYDER, P.; EL-GAZZAR, F.; MATTHEWS, M.E.; MARTH, E.H.; UNKLESBAY, N. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork prepared with and without soy hulls. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, n.5, p.573-576, May, 1995.
- [20] PAGÁN, R.; CONDÓN, S.; SALA, F.J. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.8, p.3225-3232, Aug., 1997.
- [21] PATASHNIK, M. A simplified procedure for thermal process evaluation. **Food Technology**, Champaign, v.7. n.1, p.1-6, Jan., 1953.

- [22] QUINTAVALLA, S.; CAMPANINI, M. Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.12, n.5, p.184-187, May, 1991.
- [23] RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. 632p.
- [24] SCHOENI, J.L; BRUNNER, K.; DOYLE, M.P. Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.5, p.334-337, May, 1991.
- [25] STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing**. 2 ed. Academic Press, New York, 1973. 329p.
- [26] SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F., ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3ed. Washington, APHA, 1992. Chap. 4, p.75-95.
- [27] WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: Canada. Health and Welfare. **Compendium of analytical methods: laboratory procedures of microbiological analysis of foods**. Ottawa: Polyscience, 1991. v.3. [MFHPB 30]
- [28] WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M; POWELL, C.; TIWARI, N.P.; READ, S.; PLANTE, R.; BABIUK, T.; LAFFEY, P.; KAURI, T.; MAYERS, P.; CHAMPAGNE, M.J.; HUNT, T.; LACASSE, P.; VIET, K.; SMANDO, R.; COATES, F. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, London, v.9, n.2, p.127-145, June, 1992.

- [29] YU, L.S.L.; FUNG, D.Y.C. Evaluation of FDA and USDA procedures for enumerating *Listeria monocytogenes* in ground beef. **Food Microbiology**, London, v.8, n.1, p.69-74, Mar., 1991.

CAPÍTULO 3

INFLUÊNCIA DO TEOR DE GORDURA, CLORETO DE SÓDIO E PROTEÍNA TEXTURIZADA DE SOJA NA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Listeria monocytogenes* EM FORMULAÇÕES PARA HAMBÚRGUER

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a influência do teor de gordura, cloreto de sódio e proteína texturizada de soja na resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino. Quatro formulações: 10% de gordura (F1), 20% de gordura (F2), 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio (F3) e 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada (F4) foram inoculadas com uma suspensão contendo uma mistura de 5 cepas de *L. monocytogenes*. A determinação da resistência térmica foi realizada utilizando-se tubos "TDT" fechados com tampa de borracha, em banho de água à temperatura de 55,0°C, 60,0°C e 65,0°C. Para a contagem da população sobrevivente, empregou-se ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (TPAP), e, para confirmação da colônia, a técnica de iluminação a 45°. Os valores *D* calculados por regressão linear para F1, F2, F3 e F4 foram, respectivamente, 36,11, 39,93, 62,76 e 37,97 min a 55,0°C, 2,86, 2,55, 4,32 e 3,24 min a 60,0°C e 0,34, 0,34, 0,52 e 0,36 min a 65,0°C. Os valores *z* obtidos para F1, F2, F3 e F4 foram 4,93, 4,83, 4,81 e 4,95°C, respectivamente. Os resultados demonstraram que o emprego de cloreto de sódio na formulação, à concentração de 1,5%, promove aumento na resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino.

**INFLUENCE OF THE FAT, SODIUM CHLORIDE AND TEXTURIZED SOY
PROTEIN CONTENTS ON THE THERMAL RESISTANCE OF
Listeria monocytogenes IN FORMULATIONS FOR HAMBURGER**

SUMMARY

The influence of the fat, sodium chloride and texturized soy protein contents on the thermal resistance of *L. monocytogenes* in formulations for beef hamburger was evaluated. Four formulations: 10% fat (F1), 20% fat (F2), 10% fat and 1.5% sodium chloride (F3) and 10% fat and 10.5% hydrated texturized soy protein (F4) were inoculated with a mixture of five strains of *L. monocytogenes*. Heat resistance was determined using thermal death time (TDT) tubes. The tubes were sealed with rubber stoppers and submerged in a water baths at 55.0, 60.0 and 65.0°C. The surviving cells were enumerated on tryptose phosphate agar containing 1% sodium pyruvate (TPAP) and the colonies were confirmed using an illuminator at an angle of 45 degrees. The *D*-values were determined from the survivor curves by linear regression. For F1, F2, F3 and F4 the *D*-values obtained were, respectively, 36.11, 39.93, 62.76 and 37.97 min at 55.0°C, 2.86, 2.55, 4.32 and 3.24 min at 60.0°C and 0.34, 0.34, 0.52 and 0.36 min at 65.0°C. The *z*-values were 4.93°C for F1, 4.83°C for F2 , 4.81°C for F3 and 4.95°C for F4. The results demonstrated that the addition of 1.5% sodium chloride can increase the heat resistance of *L. monocytogenes* in formulations for beef hamburger.

1. INTRODUÇÃO

O tratamento térmico é um processo amplamente empregado e uma das formas mais efetivas para destruição de microrganismos patogênicos em alimentos.

Listeria monocytogenes é considerada uma bactéria mais resistente à inativação em carne do que muitos outros microrganismos patogênicos não formadores de esporos. Além disso, produtos preparados com carne bovina moída freqüentemente são consumidos após um breve tratamento térmico, o que não garante a inativação de todas as células viáveis. Assim, informações sobre a resistência térmica do patógeno nesse tipo de alimento são de fundamental importância para o estabelecimento de processos térmicos seguros [19, 20, 23, 25].

A resistência térmica de microrganismos é influenciada por diversos fatores, inclusive as propriedades do meio de aquecimento, como por exemplo o pH, teor de água, gordura, carboidratos, proteínas e sais [27].

O teor de gordura tem influência significativa na maciez, suculência e intensidade de sabor e aroma do hambúrguer, observando-se uma preferência dos consumidores pelo produto contendo cerca de 20% de gordura. Entretanto, nos dias atuais, a preocupação com a dieta e com a saúde têm determinado o aumento da demanda por produtos de origem animal com baixo teor de gordura [7]. Para que o rótulo de um produto apresente a declaração “contém baixo teor de gordura”, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estabeleceu, entre outras exigências, que o hambúrguer deve apresentar um teor máximo de 10% deste componente [10].

Segundo GIESE [10], o elevado consumo de hambúrguer estimulou a realização de pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de formulações

contendo substitutos de gordura, inclusive derivados protéicos de soja. As vantagens atribuídas aos derivados de soja são a facilidade de uso e a familiaridade como ingrediente, além de fornecer proteína de alto valor biológico. A legislação brasileira, através da Portaria nº 115/78, permite a utilização de proteína texturizada de soja em hambúrguer até 3,5% em base seca, ou 10,5% em base hidratada, sem necessidade de declaração no rótulo do percentual empregado [24].

O cloreto de sódio é um ingrediente freqüentemente utilizado no preparo de produtos cárneos, curados ou não, e sua adição geralmente está relacionada com aspectos tecnológicos e com as características organolépticas do produto.

A fim de contribuir para um melhor conhecimento acerca da capacidade de sobrevivência de *L. monocytogenes* ao calor, e tendo em vista a possível aplicação dos resultados a outros tipos de produtos cárneos, este trabalho objetivou avaliar a influência do teor de gordura, cloreto de sódio e proteína texturizada de soja na resistência térmica de *L. monocytogenes* inoculada em formulações para hambúrguer bovino.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo dos Ingredientes

2.1.1 Carne

Peças de acém (corte dianteiro de bovino), adquiridas no comércio varejista de Campinas-SP, foram imersas em água fervente durante 2 minutos. Em seguida, a camada externa foi removida assépticamente e descartada. As porções de carne que exibiam grandes quantidades de gordura foram separadas das porções magras e moídas separadamente, a fim de serem utilizadas no ajuste

do teor de gordura das formulações. A trituração da carne foi realizada empregando-se moedor (Electrolux) provido de disco com furos de 4 mm de diâmetro. As partes removíveis estéreis do moedor foram esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 min. Após a retirada de amostras para determinação do teor de umidade e gordura, contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e detecção e contagem de *L. monocytogenes*, as porções de carne moída foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -18°C. O procedimento utilizado no preparo da carne foi similar ao descrito por SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [24].

2.1.2 Proteína Texturizada de Soja (PTS)

A proteína texturizada de soja (Santista Alimentos) foi armazenada em recipiente estéril hermético, após remoção de amostra para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e detecção e contagem de *L. monocytogenes*.

2.2 Preparo das Formulações para Hambúrguer

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de carne foram misturadas em ambiente asséptico, preparando-se 4 formulações: carne com 10% de gordura (F1), carne com 20% de gordura (F2), carne com 10% de gordura e 1,5% de NaCl (F3) e carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada (F4). Antes de ser adicionada à carne, a proteína texturizada de soja (PTS) foi hidratada na proporção de 2:1 (água:PTS) através de imersão em água estéril a 60°C durante 20 minutos.

Após mistura dos ingredientes e trituração das formulações, efetuou-se a remoção de amostras para determinação do pH, atividade de água (A_w),

composição centesimal e contagem de microrganismos aeróbios mesófilos. As formulações de hambúrguer (100g) foram, então, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e armazenadas a -18°C.

2.3 Avaliação Físico-Química e Microbiológica dos Ingredientes e das Formulações

2.3.1 Análises Físico-Químicas

Para a determinação de umidade, proteínas e cinzas foram utilizados os métodos descritos, respectivamente, nas seções 24.002, 24.027 e 24.009 da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-AOAC [2], e para a gordura empregou-se o método de BLIGH & DYER [3]. A determinação do pH seguiu a metodologia descrita por SEBRANEK (citado por SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [23]), empregando-se potenciômetro (B374, Micronal) previamente calibrado. A A_a foi avaliada utilizando-se higrômetro elétrico (AquaLab, Decagon).

2.3.2 Análises Microbiológicas

Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos: Foi realizada utilizando-se a técnica de inoculação em profundidade e o meio ágar padrão para contagem (PCA, Oxoid), com incubação das placas a 35°C/48h, conforme recomendado por SWANSON et al. [29].

Deteccão e contagem de *L. monocytogenes*: As amostras foram analisadas através de contagem direta em placas e através de enriquecimento seletivo.

Porções de 25 g de amostra foram maceradas em homogeneizador de pistões (mod.400, Stomacher), com 225 ml de caldo de enriquecimento para

Listeria desenvolvido por McCLAIN & LEE [21] (LEB, Oxoid), sem acriflavina, durante 2 min. Aliquotas de 1 ml (subdivididas em 0,3 + 0,3 + 0,3 + 0,1 ml) foram inoculadas superficialmente em placas contendo ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM, Difco), com incubação a 30°C/48h. A contagem de colônias típicas de *Listeria* foi realizada com o auxílio da iluminação a 45°, empregando-se iluminador (KL1500, Schott), espelho côncavo e microscópio estereoscópico (4752, Karl Zeiss).

A detecção da presença de *L. monocytogenes* através de enriquecimento seletivo, após adição de acriflavina (Sigma) à amostra remanescente e homogeneização durante 2 min, seguiu a metodologia recomendada por WARBURTON, FARBER, BABIUK [32], utilizando-se LPM (Difco) e ágar Oxford (Oxoid) modificado (MOX) para plaqueamento.

2.4 Determinação do Tempo “Lag” de Aquecimento

O tempo “lag” de aquecimento foi determinado a 55,0, 60,0 e 65,0°C. Dois gramas de carne foram acondicionados em tubos TDT (ϕ externo=8 mm e comprimento=105 mm) e inseriu-se um termopar de cobre-constantan (tipo T) (TT-T-36, Omega Engineering, Inc.), de forma que a junta de medida ficasse no centro geométrico da amostra. Em seguida, o tubo foi imerso em banho de gelo. Quando a temperatura da carne atingiu 5-6°C, o tubo foi transferido para um banho termostático (H-12105-10, Cole Parmer, precisão de $\pm 0,25^\circ\text{C}$) contendo água e ajustado à temperatura desejada, acionando-se no mesmo instante o cronômetro. Quando a carne atingiu a temperatura do banho, registrou-se o tempo marcado pelo cronômetro (tempo “lag” de aquecimento). A temperatura da amostra durante o aquecimento foi monitorada através do termopar conectado a um registrador de temperatura (H-92800-10, Cole Parmer), previamente programado para registrar a temperatura a cada intervalo de 5 s. Este

procedimento foi repetido 10 vezes para cada temperatura, por tipo de formulação. Os instrumentos de medida de temperatura foram aferidos com termômetros de bulbo de mercúrio (ASTM-USA), calibrados com padrões NIST (“National Institute of Standards and Technology”).

2.5 Preparo do Inóculo

O inóculo foi elaborado com uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* (*L.m.*): Scott A (sorovar 4b) e quatro cepas isoladas de carne bovina moída *L.m.* 259 (4b), *L.m.* 357 (1/2a), *L.m.* 374 (1/2a) e *L.m.* 410 (1/2a). Todas as cepas, avaliadas conforme recomendado por LOVETT & HITCHINS [18], apresentaram patogenicidade positiva em testes com camundongos. As culturas-estoque, mantidas a 4°C em tubos com ágar tripticase soja (Oxoid) inclinado contendo 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSA-YE), foram repicadas mensalmente a fim de manter a viabilidade das células.

As culturas foram ativadas mediante três transferências consecutivas para caldo tripticase soja (Oxoid) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSB-YE), a fim de se obter células na fase estacionária de crescimento. Após incubação a 35°C durante 15 horas, as suspensões foram centrifugadas (J2-21, Beckman) a 5.500 x *g* a 4°C durante 15 min e lavadas 2 vezes com tampão Butterfield. Em seguida, o sedimento final foi suspenso no mesmo diluente, de forma a se obter uma concentração de cerca de 10¹⁰ UFC/ml, conforme determinado em experimentos preliminares. Volumes iguais de cada cultura foram então misturados, efetuando-se a contagem através de inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato (TPA) (TPB, Difco; 2% de ágar, Merck) e incubação a 35°C/48h. A mistura assim preparada foi imediatamente inoculada nas formulações.

2.6 Inoculação e Acondicionamento das Formulações nos Tubos TDT

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de 100 g de carne foram inoculadas com a mistura de culturas numa proporção de 1% (v/p), seguindo-se uma homogeneização manual e, depois, em homogeneizador de pistões, durante 1 min. Em ambiente asséptico, e com a carne inoculada mantida em banho de gelo, foi efetuado o acondicionamento de 2 g nos tubos TDT (ϕ externo=8 mm e comprimento=105 mm), procedendo-se, no final, uma limpeza cuidadosa da parede interna dos tubos com “swab” estéril. Em seguida, os tubos foram fechados com tampa de borracha e armazenados a 4°C/18 h.

Resultados obtidos em testes preliminares demonstraram que o tempo de armazenamento das amostras até o tratamento térmico não teve influência na resistência térmica da bactéria.

2.7 Tratamento Térmico e Contagem de *L. monocytogenes*

Os tubos foram imersos em banho termostático (H-12105-10, Cole Parmer, precisão de $\pm 0,25^\circ\text{C}$) ajustado à temperatura de 55,0, 60,0 ou 65,0°C, de forma que o nível da água ficasse 2 cm acima do nível da carne.

Quando a amostra atingiu a temperatura do banho (ao final do tempo “lag” de aquecimento), dois tubos foram imediatamente removidos e resfriados em banho de gelo. A partir desse ponto, dois tubos foram removidos a cada um dos seguintes intervalos de tempo:

55,0°C: 20, 40, 60, 80 e 100 min

60,0°C: 2, 4, 6, 8 e 10 min

65,0°C: 0,25, 0,50, 0,75 e 1,0 min

No tratamento térmico a 55,0°C, para a formulação F3, também foram removidos dois tubos após 120 min. Nos experimentos a 65,0°C, adicionalmente,

foram retiradas amostras durante o tempo “lag” de aquecimento (dois tubos após 1,0 e 1,5 min, contados a partir da imersão no banho).

Os experimentos foram replicados duas vezes para cada temperatura, por tipo de formulação.

Após resfriamento em banho de gelo, a carne foi transferida para saco plástico estéril, procedendo-se a lavagem do tubo duas vezes com 1,5 ml de tampão Butterfield. O volume de diluente foi então completado para 18 ml, efetuando-se a homogeneização da amostra durante 2 min em homogeneizador de pistões. Em seguida, foram preparadas diluições sucessivas no mesmo diluente, com inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (TPAP) (TPB, Difco; 2% de ágar, Merck, piruvato de sódio, Merck) e incubação a 35°C/72 h. Todas as colônias típicas, observadas através de iluminação a 45°, foram consideradas *L. monocytogenes*. O mesmo método foi utilizado para avaliação da carne contida em dois tubos que não sofreram tratamento térmico.

2.8 Determinação dos Valores D e z

A duração do tratamento térmico empregado foi corrigido para considerar o efeito do tempo “lag”, calculando-se o tempo de aquecimento equivalente à temperatura de referência (temperatura do banho). Nos experimentos realizados a 65,0°C, os intervalos de tempo decorrentes da remoção de amostras durante o tempo “lag” também foram considerados para o cálculo do tempo de aquecimento à temperatura de referência.

Utilizando-se os dados de temperatura registrados durante o tempo “lag” de aquecimento foi possível calcular as taxas letais, empregando-se a fórmula do método geral [28]:

$$L=10^{(T-T_R)/z}$$

onde L é a taxa letal, T é a temperatura da amostra durante o aquecimento (°C), T_R é a temperatura de referência (temperatura do banho) (°C) e o valor z inicial considerado foi de 5,25°C [média dos valores obtidos através de regressão linear das curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D$ x temperatura), considerando-se a contagem obtida no tempo “lag” como contagem no tempo “zero” de aquecimento]. Em seguida, utilizando-se o método de PATASHNIK [22], foi calculado o tempo de aquecimento à temperatura do banho.

Esses tempos corrigidos foram usados na determinação dos valores D , obtidos por regressão linear das curvas de sobrevivência ($\log_{10}$ do número de sobreviventes x tempo de aquecimento). As curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D$ x temperatura) foram então traçadas, obtendo-se os valores z através de regressão linear. Como a taxa letal é função do valor z, todo o cálculo foi repetido até que o valor z calculado e o valor z inicial fossem rigorosamente iguais.

2.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), complementando-se a análise com o teste de Duncan para comparação de médias. Em todos os testes foi considerado um nível de 5% de significância. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação Microbiológica dos Ingredientes

A contagem obtida para microrganismos aeróbios mesófilos foi de $3,00 \times 10^3$ e $6,10 \times 10^4$ UFC/g para as porções de carne com baixo e alto teor de gordura, respectivamente. Para a PTS, obteve-se uma contagem de $2,58 \times 10^2$ UFC/g. Na análise para detecção e contagem de *L. monocytogenes* nos ingredientes não foi observada nenhuma colônia típica.

3.2 Avaliação Físico-Química e Microbiológica das Formulações

Na *Tabela 1* são apresentados os resultados obtidos na análise físico-química das formulações.

TABELA 1. Características físico-químicas das formulações de hambúrguer^a

	Formulações ^b			
	F1	F2	F3	F4
pH	5,72	5,72	5,69	5,89
A _a	0,990	0,990	0,981	0,990
Umidade (%)	70,71	62,13	68,90	69,54
Proteínas (%)	18,50	16,96	19,08	19,38
Lipídeos (%)	10,38	20,46	10,49	9,77
Cinzas (%)	0,89	0,84	2,22	1,04

a: valor médio de 3 amostras

b: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Pode-se observar que a adição de PTS à carne (F4) resultou em pequeno aumento do valor de pH (cerca de 0,2 unidades). Os valores obtidos para a A_a demonstram que não houve diferença entre as formulações F1, F2 e F4, enquanto

que a adição de NaCl (F3) promoveu redução da A_a . O cloreto de sódio, assim como outros solutos, tem a propriedade de reduzir a atividade de água [26]. Além disso, pode ser verificado que os resultados obtidos para lipídeos estão próximos dos teores pré-definidos.

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos nas formulações foi de $1,05 \times 10^4$, $9,50 \times 10^3$, $3,40 \times 10^4$ e $1,90 \times 10^4$ UFC/g para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, indicando que a manipulação e o processo de trituração das formulações não contribuiu para o aumento da contaminação, considerando-se as contagens iniciais do principal ingrediente, a carne.

3.3 Determinação dos Valores D

A contagem de *L. monocytogenes* obtida nas amostras que não sofreram tratamento térmico variou de 7,49 a 7,89 $\log_{10}$ UFC/g para F1, de 7,59 a 7,77 $\log_{10}$ UFC/g para F2, de 7,53 a 7,85 $\log_{10}$ UFC/g para F3 e de 7,88 a 8,07 $\log_{10}$ UFC/g para F4, demonstrando uma variação de cerca de 0,5 ciclo logarítmico no inóculo inicial nos tratamentos realizados a diferentes temperaturas.

A redução da contaminação da carne fresca e uma inoculação a este nível elevado permitiu a contagem da bactéria em meio de cultura não seletivo, que possibilita a recuperação de células injuriadas pelo calor (TPAP), com uma interferência não significativa da microbiota contaminante. Procedimento semelhante foi utilizado na determinação de resistência térmica de *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* O157:H7 em carne bovina moída [6, 9, 11, 12, 16, 23].

As curvas de sobrevivência de *L. monocytogenes* nas diferentes formulações submetidas a temperaturas de 55,0, 60,0 e 65,0°C são apresentadas

na Figura 1, podendo-se observar a existência de relação linear entre $\log_{10}$ dos sobreviventes e o tempo de aquecimento.

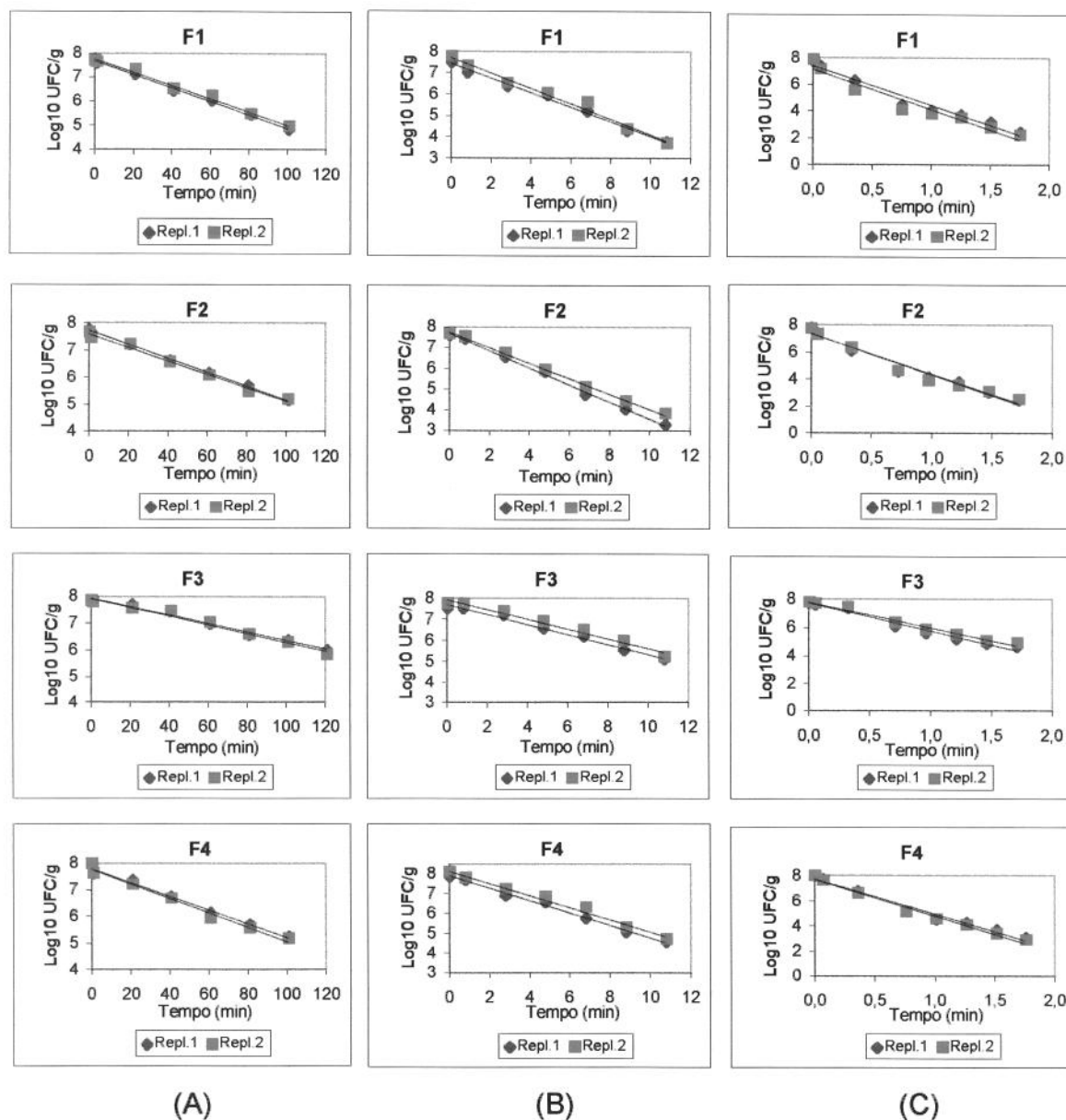


FIGURA 1. Curvas de sobrevivência de *L. monocytogenes* em formulações de hambúrguer a 55,0°C (A), 60,0°C (B) e 65,0°C (C).

F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Repl.1, Repl.2: replicatas 1 e 2

3.3.1 Influência do Teor de Gordura

Os resultados da análise de regressão linear dos dados e os valores D obtidos podem ser observados na *Tabela 2*. Os valores D médios para as formulações com 10 (F1) e 20% (F2) de gordura foram, respectivamente, 36,11 e 39,93 min a 55,0°C, 2,86 e 2,55 min a 60,0°C e 0,34 e 0,34 min a 65,0°C.

Utilizando meio não seletivo para recuperação dos sobreviventes, SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [23] obtiveram valores D para *L. monocytogenes* em carne bovina moída com 10% de gordura de 22,4 min a 54,4°C, 15,7 min a 57,2°C, 4,47 min a 60,0°C, 2,56 min a 62,8°C, e um valor z de 7,9°C. FAIN et al. [9] verificaram que a 51,7, 57,2 e 62,8°C os valores D em carne moída com 2,0% de gordura eram 81,3, 2,6 e 0,6 min, respectivamente; enquanto que na carne com 30,5% de gordura, valores de 71,1, 5,8 e 1,2 min foram obtidos. Os valores z encontrados para carne com baixo e alto teor de gordura foram, respectivamente, 5,17 e 6,33°C.

Existem outros trabalhos, citados na literatura, em que se utilizou meio não seletivo; entretanto o teor de gordura da carne em estudo não é fornecido. FARBER [8] encontrou valores D de 13,18 min a 56°C, 3,12 min a 60°C, 1,01 min a 62°C, e valor z igual a 4,92°C. MACKEY et al. [20], por sua vez, obtiveram $D_{55^{\circ}\text{C}} = 21$ min, $D_{60^{\circ}\text{C}} = 3,8$ min, $D_{65^{\circ}\text{C}} = 0,93$ min e $z = 7,2^{\circ}\text{C}$. JORGENSEN, STEPHENS, KNOCHER [12] verificaram ser necessário um tempo de 4,1 min para obter uma redução de 4D a 60°C, em carne com pH 5,62. Experimentos realizados por HANSEN & KNOCHER [11], em carne com pH 5,64, resultaram em valores D iguais a 26,8, 6,7 e 1,4 min a 56, 60 e 64°C, respectivamente; o valor z encontrado foi de 6,9°C.

TABELA 2. Resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações de hambúrguer

Temperatura (°C)	Form. ^a	Repl. ^b	Equação de Regressão	Valor R ²	Valor D (min)	Valor D médio (min)
55,0	F1	1	y= 7,670 - 0,0281x	0,9972	35,59	36,11 A (0,74) ^c
		2	y= 7,735 - 0,0273x	0,9878	36,63	
	F2	1	y= 7,706 - 0,0253x	0,9991	39,53	39,93 B (0,56)
		2	y= 7,591 - 0,0248x	0,9905	40,32	
	F3	1	y= 7,927 - 0,0157x	0,9873	63,79	62,76 C (1,46)
		2	y= 7,905 - 0,0162x	0,9793	61,73	
	F4	1	y= 7,775 - 0,0257x	0,9917	38,91	37,97 D (1,33)
		2	y= 7,755 - 0,0270x	0,9831	37,03	
60,0	F1	1	y= 7,408 - 0,3391x	0,9923	2,95	2,86 A (0,13)
		2	y= 7,706 - 0,3615x	0,9830	2,77	
	F2	1	y= 7,672 - 0,4125x	0,9968	2,42	2,55 A (0,19)
		2	y= 7,723 - 0,3730x	0,9969	2,68	
	F3	1	y= 7,689 - 0,2350x	0,9880	4,26	4,32 B (0,08)
		2	y= 7,919 - 0,2289x	0,9764	4,37	
	F4	1	y= 7,895 - 0,3124x	0,9952	3,20	3,24 A (0,05)
		2	y= 8,117 - 0,3059x	0,9853	3,27	
65,0	F1	1	y= 7,363 - 2,9475x	0,9702	0,34	0,34 A (0,01)
		2	y= 7,133 - 3,0056x	0,9404	0,33	
	F2	1	y= 7,336 - 2,9572x	0,9692	0,34	0,34 A (0,01)
		2	y= 7,336 - 3,0011x	0,9689	0,33	
	F3	1	y= 7,719 - 1,9580x	0,9754	0,51	0,52 A (0,01)
		2	y= 7,778 - 1,8159x	0,9795	0,53	
	F4	1	y= 7,759 - 2,7902x	0,9786	0,36	0,36 A (0,01)
		2	y= 7,730 - 2,8889x	0,9846	0,35	

a: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de NaCl

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

b: replicatas 1 e 2

c: desvio padrão entre parênteses

A-D: para cada temperatura de aquecimento, valores na mesma coluna seguidos de letras diferentes são significativamente diferentes (P<0,05)

Vários fatores podem influir na determinação da resistência térmica, incluindo o teor de gordura, A_a e pH da carne, cepas utilizadas e fase de crescimento da bactéria, além da técnica empregada no tratamento térmico e o método de recuperação dos sobreviventes, o que dificulta a comparação entre os resultados obtidos em diferentes trabalhos. Apesar disso, pode-se observar que os valores D calculados para F1 e F2 encontram-se dentro da faixa de valores citados na literatura para *L. monocytogenes*.

Em trabalhos que avaliaram a resistência térmica de *E. coli* O157:H7 em carne bovina moída com teor de gordura entre 7 e 20% foram obtidos valores D a 60°C entre 0,45 e 3,17 min [1, 13, 14]. À mesma temperatura, os valores D relatados para *Salmonella* variaram entre 0,9 e 1,2 min, em carne contendo 15 a 21% de gordura [6, 30]. Portanto, os valores $D_{60^\circ\text{C}}$ obtidos em nosso trabalho na carne com 10 e 20% de gordura poderiam indicar que a resistência térmica de *L. monocytogenes* não difere muito das dessas bactérias.

A comparação entre os valores D obtidos para F1 e F2 (Tabela 2) mostra que a 60,0 e 65,0°C não existe diferença significativa ($P < 0,05$) entre as formulações, enquanto que a 55,0°C os valores D são próximos, indicando que o aumento do teor de gordura da carne não exerce efeito significativo na resistência térmica da bactéria. FAIN et al. [9] avaliaram a resistência térmica de *L. monocytogenes* em carne bovina moída com 2,0 e 30,5% de gordura e verificaram aumento do valor D com a elevação do teor de gordura, a 57,2 e 62,8°C. O efeito protetor da gordura também foi observado por LINE et al. [16] e AHMED, CONNER, HUFFMAN [1] em carne inoculada com *E. coli* O157:H7. Entretanto, MACKEY et al. [20] verificaram que a adição de 30% de gordura à carne bovina não resultava em efeito significativo na resistência térmica de *L. monocytogenes* entre 55 e 70°C. BUNCIC et al. [4], por sua vez, constataram redução nos valores D a 62°C com o aumento do teor de gordura na carne suína. KOTROLA, CONNER, MIKEL [15] não observaram qualquer efeito do teor de

gordura na resistência térmica de *E. coli* O157:H7, em produtos de peru. TAMMINGA, BEUMER, KAMPELMACHER [30] obtiveram valores *D* semelhantes para *Salmonella typhimurium* em carne para hambúrguer contendo 15 e 30% de gordura, entre 55 e 70°C.

A maior resistência térmica dos microrganismos, observada em alimentos com elevado teor de gordura, é atribuída à redução da atividade de água. Entretanto, como pode ser observado na *Tabela 1*, os valores de A_a obtidos para F1 e F2 foram iguais (0,990), o que poderia justificar a similaridade entre os valores *D* encontrados nessas formulações.

3.3.2 Influência do Teor de Cloreto de Sódio

Os valores *D* médios para a formulação contendo 10% de gordura e 1,5% de NaCl (F3) a 55,0, 60,0 e 65,0°C foram, respectivamente, 62,76, 4,32 e 0,52 min (*Tabela 2*). Comparando-se os valores *D* obtidos para F1 e F3, observa-se a existência de diferença significativa ($P < 0,05$) entre as duas formulações a 55,0 e 60,0°C, mas não a 65,0°C. Além disso, pode ser verificado que a 55,0°C a adição de sal aumentou a resistência térmica 1,7 vezes, enquanto que a 60,0°C um aumento de 1,5 vezes foi observado. Esses resultados demonstram que, dependendo da temperatura de aquecimento, a adição de sal à carne promove um aumento na resistência térmica de *L. monocytogenes*, coincidindo, portanto, com resultados obtidos por outros pesquisadores.

YEN, SOFOS, SCHMIDT [33] aqueceram carne suína moída até temperatura interna de 60°C e verificaram que a destruição da bactéria diminuía com o aumento do teor de NaCl (1 a 3%) na carne. JORGENSEN, STEPHENS, KNOCHEL [12] constataram que a adição de 6,5% de NaCl à carne bovina moída resultou em valor $D_{60^\circ\text{C}}$ 2,6 vezes maior que na carne sem sal. FARBER [8] e

MACKEY et al. [20] também observaram um aumento bastante significativo nos valores *D*, quando foi adicionado à carne bovina sal de cura contendo NaCl.

Segundo YEN, SOFOS, SCHMIDT [33] e JORGENSEN, STEPHENS, KNOCHEL [12], o efeito protetor do cloreto de sódio se deve a mudanças fisiológicas na célula bacteriana, relacionadas com a redução da A_w do meio de aquecimento. Assim sendo, uma menor atividade de água da formulação F3 (Tabela 1) poderia explicar o aumento na resistência térmica da bactéria.

Em estudos realizados para avaliar o efeito do cloreto de sódio na resistência térmica dos microrganismos, observou-se que o efeito do sal depende, entre outros fatores, da temperatura de aquecimento. YEN, SOFOS, SCHMIDT [34] verificaram que a adição de 2% de NaCl à carne suína protegeu as células de *L. monocytogenes* no tratamento térmico até 50-60°C, mas não no aquecimento até 65 e 68°C. COLE et al. [5] e LINTON et al. [17] observaram que a influência do sal na resistência térmica de *L. monocytogenes* diminuía com o aumento da temperatura de aquecimento (56 a 62°C e 50 a 60°C, respectivamente). TUNCAN & MARTIN [31], por sua vez, também constataram que o efeito protetor do NaCl sobre *Staphylococcus aureus* era maior a temperaturas mais baixas.

3.3.3 Influência do Teor de Proteína Texturizada de Soja

Os valores *D* médios obtidos para F4 (10% de gordura e 10,5% de PTS hidratada) foram: 37,97 min a 55,0°C, 3,24 min a 60,0°C e 0,36 min a 65,0°C (Tabela 2). A comparação com os valores *D* obtidos para F1 mostra que, apesar de haver diferença significativa ($P < 0,05$) entre as duas formulações a 55,0°C, os valores *D* são bastante próximos, indicando que a adição de 10,5% de PTS à carne tem pouca influência na resistência térmica de *L. monocytogenes*.

CRAVEN & BLANKENSHIP [6] avaliaram a influência da adição de diferentes teores de PTS à carne bovina na resistência térmica de *Salmonella* sp. Os autores verificaram que o efeito deste ingrediente dependia do pH final da mistura. A resistência térmica da bactéria aumentou apenas quando o pH da mistura atingiu um valor igual ou superior a 6,1 (20% ou mais de PTS hidratada, 1 água: 3 proteína).

O pH do meio de aquecimento interfere na resistência térmica dos microrganismos. COLE et al. [5] e LINTON et al. [17] observaram que a resistência térmica de *L. monocytogenes* aumentava quando o pH do meio aumentava de 4,2 até 7,0.

Na *Tabela 1* pode ser observado que a adição de 10,5% de PTS (F4) provocou uma elevação no valor do pH de cerca de 0,2 unidades, quando comparado com F1. Entretanto, este incremento não foi suficiente para promover um aumento na resistência térmica da bactéria.

3.4 Determinação dos Valores z

Os valores z obtidos para *L. monocytogenes* nas formulações de hambúrguer são apresentados na *Tabela 3*. Observa-se que os valores z obtidos foram praticamente iguais para todas as formulações, e estão próximos dos valores citados na literatura para *L. monocytogenes* e outras bactérias não formadoras de esporos.

TABELA 3. Valores z para *L. monocytogenes* em formulações de hambúrguer

Formulação ^a	Equação de Regressão	Valor R ²	Valor z (°C)
F1	y= 12,696 - 0,2030x	0,9977	4,93
F2	y= 12,933 - 0,2070x	0,9926	4,83
F3	y= 13,200 - 0,2080x	0,9956	4,81
F4	y= 12,670 - 0,2020x	0,9988	4,95

a: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de NaCl

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Apesar de o cloreto de sódio ter promovido um aumento substancial nos valores *D* para *L. monocytogenes*, ele não teve influência no valor z. Um maior efeito do NaCl sobre o valor *D* também foi observado por TUNCAN & MARTIN [31] com *S. aureus*. Segundo HANSEN & RIEMANN (citados por SORQVIST [27]), o valor *D* parece ser mais dependente da composição do meio de aquecimento do que o valor z, o que justifica os resultados encontrados.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que um aumento de dez pontos percentuais no teor de gordura da carne e a adição de 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada não tiveram influência na resistência térmica de *L. monocytogenes*, quando comparados com a formulação para hambúrguer contendo 10% de gordura. Entretanto, a adição de 1,5% de NaCl promoveu aumento na resistência térmica da bactéria.

Em termos práticos, o aumento da resistência térmica conferido pelo sal indica que, do ponto de vista da qualidade higiênico-sanitária do produto final, é mais seguro fabricar hambúrguer sem sal, adicionando esse ingrediente após o cozimento. Além disso, em tratamentos térmicos entre 55 e 60°C, produtos elaborados com carne bovina moída contendo 1,5% de cloreto de sódio devem ser aquecidos por um período de tempo 1,5 a 1,7 vezes superior ao do produto sem sal, a fim de se obter um processo com a mesma letalidade para *L. monocytogenes*.

Assim sendo, o efeito do NaCl deve ser considerado no estabelecimento de tratamentos térmicos seguros para produtos cárneos contendo esse ingrediente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AHMED, N.M.; CONNER, D.E.; HUFFMAN, D.L. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.3, p.606-610, May-June, 1995.
- [2] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14 ed. Arlington, 1984. 1141p.
- [3] BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
- [4] BUNCIC, S.; PAUNOVIC, L.; VOJINOVIC, G.; RADISIC, D. The effect of fat and moisture on the thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in minced meat. **Tehnologija-Mesa**, v.34, n.1, p.32-34, 1993. *Apud: Food Science and Technology Abstracts*, 94-06-S0095, CD-ROM.
- [5] COLE, M.B.; DAVIES, K.W.; MUNRO, G.; HOLYOAK, C.D.; KILSBY, D.C. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Industrial Microbiology**, Basingstoke, v.12, n.3-5, p.232-239, Mar.-May, 1993.
- [6] CRAVEN, S.E.; BLANKENSHIP, L.C. Increased heat resistance of salmonellae in beef with added soy proteins. **Journal of Food Protection**, Ames, v.46, n.5, p.380-384, May, 1983.
- [7] EGBERT, W.R.; HUFFMAN, D.L.; CHEN, C-M.; DYLEWSKI, D.P. Development of low-fat ground beef. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.6, p.64-73, June, 1991.

- [8] FARBER, J.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.8, n.3, p.285-291, June, 1989.
- [9] FAIN, A.R., Jr.; LINE, J.E.; MORAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.; CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value e z-value determinations in ground beef and turkey. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.10, p.756-761, Oct., 1991.
- [10] GIESE, J. Developing low-fat meat products. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.4, p.100-108, Apr., 1992.
- [11] HANSEN, T.B.; KNOCHER, S. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during rapid and slow heating in sous vide cooked beef. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.22, n.6, p.425-428, June, 1996.
- [12] JORGENSEN, F.; STEPHENS, P.J.; KNOCHER, S. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.274-281, Sept., 1995.
- [13] JUNEJA, V.K.; SNYDER, O.P.Jr.; MARMER, B.S. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.35, n.3, p.231-237, Apr., 1997.

- [14] JUNEJA, V.K.; KLEIN, P.G.; MARMER, B.S. Heat shock and thermotolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in a model beef gravy system and ground beef. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, n.4, p.677-684, Apr., 1998.
- [15] KOTROLA, J.S.; CONNER, D.E.; MIKEL, W.B. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in cooked turkey products. **Journal of Food Science**, Chicago, v.62, n.4, p.875-877, 905, July-Aug., 1997.
- [16] LINE, J.E.; FAIN, A.R., Jr.; MORAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.; CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and z-value determinations in ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.10, p.762-766, Oct., 1991.
- [17] LINTON, R.H.; CARTER, W.H.; PIERSON, M.D.; HACKNEY, C.R., EIFERT, J.D. Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.1, p.16-23, Jan., 1996.
- [18] LOVETT, J.; HITCHINS, A.D. *Listeria* isolation. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 6 ed. (Suppl.) 2nd printing (2/89). Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1989. Chap. 29, p.29.01-29.14.
- [19] MACKEY, B.M.; BRATCHELL, N. A review. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.9, n.3, p.89-94, Sept., 1989.

- [20] MACKEY, B.M.; PRITCHET, C.; NORRIS, A.; MEAD, G.C. Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.10, n.6, p.251-255, June, 1990.
- [21] McCLAIN, D.; LEE, W.H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p.660-664, May-June, 1988.
- [22] PATASHNIK, M. A simplified procedure for thermal process evaluation. **Food Technology**, Champaign, v.7. n.1, p.1-6, Jan., 1953.
- [23] SCHOENI, J.L; BRUNNER, K.; DOYLE, M.P. Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.5, p.334-337, May, 1991.
- [24] SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SNDA). Regula o emprego de soja texturizada. Portaria nº 115 de 25 jul. 1978. **Diário Oficial**, República Federativa do Brasil, Brasília, 01 ago. 1978.
- [25] SHELEF, L.A. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4 and 25°C. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.6, p.379-383, June, 1989.
- [26] SMITH, J.L.; HUNTER, S.E. Heat injury in *Listeria monocytogenes*: prevention by solutes. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v.21, n.5, p.307-311, Oct., 1988.
- [27] SORQVIST, S. Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.76, n.4, p.383-388, Apr., 1994.

- [28] STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing**. 2 ed.
Academic Press, New York, 1973. 329p.
- [29] SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G.
Colony count methods. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F.,
ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of
foods**. 3ed. Washington, APHA, 1992. Chap. 4, p.75-95.
- [30] TAMMINGA, S.K.; BEUMER, R.R.; KAMPELMACHER, E.H. Microbiological
studies on hamburgers. **Journal of Hygiene**, London, v.88, n.1, p.125-
142, Feb., 1982.
- [31] TUNCAN, E.U.; MARTIN, S.E. Combined effects of salts and temperature on
the thermal destruction of *Staphylococcus aureus* MF-31. **Journal of
Food Science**, Chicago, v.55, n.3, p.833-836, May-June, 1990.
- [32] WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria
monocytogenes* from all food and environmental samples. In: Canada.
Health and Welfare. **Compendium of analytical methods: laboratory
procedures of microbiological analysis of foods**. Ottawa: Polyscience,
1991. v.3. [MFHPB 30]
- [33] YEN, L.C.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Effect of meat curing ingredients
on thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork.
Journal of Food Protection, Ames, v.54, n.6, p.408-412, June, 1991.
- [34] YEN, L.C.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Thermal destruction of *Listeria
monocytogenes* in ground pork with water, sodium chloride and other
curing ingredients. **Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie**,
London, v.25, n.1, p.61-65, Feb., 1992.

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS INGREDIENTES, TEMPO DE FRITURA E TEMPERATURA FINAL DOS HAMBÚRGUERES NA INJÚRIA E DESTRUIÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

RESUMO

Neste trabalho foi avaliada a influência dos ingredientes, tempo de fritura e temperatura final dos hambúrgueres na injúria e destruição de *L. monocytogenes*. Foram preparadas 4 formulações de hambúrguer bovino: 10% de gordura (F1), 20% de gordura (F2), 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio (F3) e 10% de gordura e 10,5% de PTS hidratada (F4), inoculadas com uma suspensão contendo uma mistura de 5 cepas de *L. monocytogenes*. Os hambúrgueres (113 g) congelados (-18°C) foram fritos em chapa elétrica a $185 \pm 5^\circ\text{C}$, reproduzindo-se o preparo comercial do produto. Oito hambúrgueres de cada formulação foram submetidos a fritura durante 2, 4, 6, 8 e 10 minutos, procedendo-se a viragem dos mesmos na metade do tempo total. Quatro hambúrgueres foram imediatamente resfriados após a fritura, enquanto outros quatro foram mantidos fora da chapa (à temperatura ambiente) durante 1 min, simulando assim o tempo de espera habitual dos estabelecimentos comerciais. A contagem da bactéria foi efetuada empregando-se ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (TPAP) e ágar triptose fosfato adicionado de 4% de NaCl (TPAS), com confirmação da colônia através da técnica de iluminação a 45°. As contagens obtidas em TPAP e TPAS demonstraram que o processo de fritura não provoca injúria na população sobrevivente. Observou-se também que o efeito da fritura sobre a população de *L. monocytogenes* passou a ser mais intenso somente a partir de 6 min de processo. A fritura, seguida de imediato resfriamento, promoveu uma redução da contagem da ordem de 2,01,

2,72, 1,92 e 2,25 ciclos logarítmicos para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, após 6 min. Após 8 min, a população foi reduzida em 3,78, 3,73, 3,03 e 3,79 ciclos logarítmicos, enquanto após 10 min de fritura a redução obtida foi de 5,28, 4,46, 3,77 e 5,95 ciclos logarítmicos. O processo com tempo adicional de espera de 1 min promoveu redução na contagem da ordem de 2,80, 3,08, 2,85 e 2,85 ciclos logarítmicos para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, após 6 min de fritura. Após 8 min, a redução foi de 4,45, 4,04, 3,61 e 4,51, enquanto que após 10 min a população foi reduzida em 6,77, 5,38, 4,21 e 6,48 ciclos logarítmicos. Os resultados mostraram que a presença de NaCl, à concentração de 1,5%, e o tempo de espera após a fritura, exercem influência na letalidade do processo para *L. monocytogenes*, em hambúrguer.

**INFLUENCE OF THE INGREDIENTS, COOKING TIME AND FINAL
TEMPERATURE OF THE HAMBURGERS ON THE INJURY AND
DESTRUCTION OF *Listeria monocytogenes***

SUMMARY

The influence of the ingredients, cooking time and final temperature of the hamburgers on the injury and destruction of *L. monocytogenes* was evaluated. Four beef hamburger formulations : 10% fat (F1), 20% fat (F2), 10% fat and 1.5% sodium chloride (F3) and 10% fat and 10.5% texturized soy protein (F4) were inoculated with a mixture of five strains of *L. monocytogenes*. Frozen hamburgers (113 g) were cooked on a preheated ($185 \pm 5^{\circ}\text{C}$) electric griddle. For each formulation, eight hamburgers were fried for 2, 4, 6, 8 and 10 minutes, each being turned over after half the time had elapsed. Following frying, four hamburgers were immediately cooled, whilst the other four samples, after removal from the griddle, were held at room temperature for 1 min. This was performed to simulate the usual preparation in commercial establishments. The survivors were enumerated on tryptose phosphate agar containing 1% sodium pyruvate (TPAP) and on tryptose phosphate agar with 4% added sodium chloride (TPAS). Colonies were confirmed by using an illuminator at an angle of 45 degrees. The recovery on TPAP and TPAS demonstrated that the survivors were not injured by the thermal treatment. The effect of frying became more intense as from 6 min of processing. The cooking process, followed by rapid cooling, resulted in 2.01, 2.72, 1.92 and 2.25 log reductions for F1, F2, F3 and F4, respectively, after a heating time of 6 min. When the samples were cooked for 8 min, the survivors were reduced by 3.78, 3.73, 3.03 and 3.79 log cycles. After 10 min, the reductions obtained were 5.28, 4.46, 3.77 and 5.95. The cooking process with a 1 min holding time resulted in 2.80, 3.08, 2.85 and 2.85 log reductions for F1, F2, F3 and F4, respectively, after a heating time of 6 min. When the samples were cooked for 8 min, the

survivors were reduced by 4.45, 4.04, 3.61 and 4.51 log cycles. After 10 min, the reductions obtained were 6.77, 5.38, 4.21 and 6.48. The results showed that the addition of sodium chloride and the holding time can affect the lethality of the cooking process for *L. monocytogenes* in hamburger.

1. INTRODUÇÃO

O hambúrguer bovino consiste, basicamente, em uma mistura moldada de carne e gordura moídas, adicionada ou não de sal e condimentos. Com finalidade econômica ou tecnológica, derivados protéicos de soja também podem ser utilizados como ingredientes [13, 51].

O teor de gordura exerce grande influência nas características sensoriais do hambúrguer. Apesar da preferência dos consumidores pelo produto contendo cerca de 20% de gordura (HUFFMAN & EGBERT, citados por EGBERT et al [18]), o aumento da demanda por produtos cárneos com baixo teor de gordura despertou o interesse das indústrias e pesquisadores para o desenvolvimento de formulações de hambúrguer contendo 10% ou menos de gordura, adicionadas de substitutos de gordura, inclusive derivados protéicos de soja [18, 26].

No Brasil, é permitida a adição de proteína texturizada de soja em hambúrguer até o teor máximo de 3,5% em base seca, ou 10,5% em base hidratada, sem necessidade de declarar, no rótulo, o percentual empregado [46].

Nenhuma etapa do processamento de hambúrguer permite eliminar ou reduzir a contaminação devida a microrganismos patogênicos ou deterioradores. Assim, a qualidade higiênico-sanitária do produto final é determinada principalmente pela contaminação superficial dos cortes e aparas de carne utilizados, embora a contaminação proveniente de outros ingredientes, do ambiente, equipamentos e manipuladores, e as condições de tempo e temperatura empregadas durante o processamento, armazenamento e exposição para venda, também possam contribuir para o aumento de microrganismos no produto [16, 24, 27, 51].

Trabalhos realizados em diferentes países, inclusive no Brasil, têm evidenciado elevados índices de contaminação e presença de bactérias

patogênicas em hambúrgueres congelados produzidos industrialmente, coletados na indústria ou no varejo [2, 9, 17, 27, 43, 51, 53, 54].

Resultados obtidos por GILL et al. [27], ROSSI, SCHOCKEN-ITURRINO, NADER [43] e COELHO & BARBOSA [9] mostraram que hambúrgueres fabricados artesanalmente podem apresentar uma qualidade higiênico-sanitária ainda mais comprometida. No Brasil, segundo ROSSI, SCHOCKEN-ITURRINO, NADER [43], vários estabelecimentos fabricam hambúrguer no próprio local de comercialização, geralmente sob condições higiênicas inadequadas e sem a devida fiscalização sanitária.

Listeria monocytogenes é uma bactéria psicotrófica, de distribuição ubíqua, razão pela qual pode ser encontrada com relativa frequência em carne bovina moída [5, 10, 15, 33, 47, 49, 57]. Além disso, a elevada resistência ao processo de congelamento e ao armazenamento congelado [25, 40] justifica a presença dessa bactéria em carne moída e hambúrguer congelados [20, 38, 41, 47].

A utilização de tratamentos térmicos inadequados no preparo do hambúrguer para consumo pode resultar na sobrevivência de microrganismos, inclusive bactérias patogênicas responsáveis por enfermidades alimentares [17, 53]. A ocorrência de elevada contaminação e a presença de bactérias patogênicas em hambúrgueres prontos para o consumo foram observadas por DITSCHAEVER, BULLOCK, ARNOTT [17], FRASER [23], TAMMINGA, BEUMER, KAMPELMACHER [53], COELHO & BARBOSA [9]. Hambúrgueres mal cozidos contaminados com *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* O157:H7 foram responsáveis por diversos surtos de enfermidade alimentar relatados [6, 7, 8, 22, 42, 44].

Segundo ORTA-RAMIREZ et al. [39], recentemente o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) determinou, como letalidade padrão, que

o tratamento térmico utilizado no preparo de hambúrguer deve promover uma redução de 5 ciclos logarítmicos na população de *Salmonella*. Entretanto, segundo SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [45] e FAIN et al. [19], *L. monocytogenes* parece ser mais resistente ao calor em carne bovina moída do que *Salmonella* sp.

Em experimentos realizados para determinar a resistência térmica de *L. monocytogenes* e outras bactérias em carne bovina moída, observou-se que o aumento do teor de gordura da carne [1, 19, 35], a adição de cloreto de sódio [31] e de proteína texturizada de soja [12] podem proteger a célula bacteriana do efeito do calor. Além disso, alguns pesquisadores demonstraram que as características físico-químicas do hambúrguer, inclusive o teor de gordura, podem ter influência na velocidade de penetração de calor durante o tratamento térmico do produto [28, 36, 55, 56].

A fim de contribuir para um melhor conhecimento sobre a capacidade de sobrevivência de *L. monocytogenes* frente a diferentes componentes sob condições de aquecimento, este trabalho objetivou estudar a influência dos ingredientes, tempo de fritura e temperatura final dos hambúrgueres na injúria e destruição de *L. monocytogenes*, simulando as condições normalmente empregadas no preparo comercial do produto para consumo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo dos Ingredientes

2.1.1 Carne

Peças de acém (corte dianteiro de bovino), adquiridas no comércio varejista de Campinas-SP, foram imersas em água fervente durante 2 min. Em seguida, a camada externa foi removida assépticamente e descartada. As porções

de carne que exibiam maior quantidade de gordura foram separadas das porções magras e moídas separadamente, a fim de serem utilizadas no ajuste do teor de gordura das formulações. A trituração da carne foi realizada empregando-se moedor (Electrolux) provido de disco com furos de 4 mm de diâmetro. As partes removíveis do moedor foram esterilizadas em autoclave a 121°C durante 15 min. Após a retirada de amostras para determinação dos teores de umidade e gordura, contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e detecção e contagem de *L. monocytogenes*, as porções de carne moída foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -18°C. O procedimento utilizado no preparo da carne foi similar ao descrito por SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [45].

2.1.2 Proteína Texturizada de Soja (PTS)

A proteína texturizada de soja (Santista Alimentos) foi armazenada em recipiente estéril hermético, após remoção de amostra para contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e detecção e contagem de *L. monocytogenes*.

2.2 Preparo das Formulações para Hambúrguer

Após descongelamento a 4°C/24h, as porções de carne foram misturadas em ambiente asséptico, preparando-se 4 formulações: carne com 10% de gordura (F1), carne com 20% de gordura (F2), carne com 10% de gordura e 1,5% de NaCl (F3) e carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada (F4). Antes de ser adicionada à carne, a proteína texturizada de soja (PTS) foi hidratada na proporção de 2:1 (água:PTS) através de imersão em água estéril a 60°C durante 20 min.

Após mistura dos ingredientes e trituração das formulações, efetuou-se a remoção de amostras para determinação do pH, atividade de água (A_a), composição centesimal e contagem de microrganismos aeróbios mesófilos.

2.3 Avaliação Físico-Química e Microbiológica dos Ingredientes e das Formulações

2.3.1 Análises Físico-Químicas

Para a determinação de umidade, proteínas e cinzas foram utilizados os métodos descritos, respectivamente, nas seções 24.002, 24.027 e 24.009 da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC [3], e para a gordura empregou-se o método de BLIGH & DYER [4]. A determinação do pH seguiu a metodologia descrita por SEBRANEK (citado por SCHOENI, BRUNNER, DOYLE [45], empregando-se potenciômetro (B374, Micronal) previamente calibrado. A A_a foi avaliada utilizando-se higrômetro elétrico (AquaLab, Decagon).

2.3.2 Análises Microbiológicas

Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos: Foi realizada utilizando-se a técnica de inoculação em profundidade e o meio ágar padrão para contagem (PCA, Oxoid), com incubação das placas a 35°C/48h, conforme recomendado por SWANSON et al. [52].

Detecção e contagem de *L. monocytogenes*: As amostras foram analisadas através de contagem direta em placas e através de enriquecimento seletivo.

Porções de 25 g de amostra foram maceradas em homogeneizador de pistões (mod.400, Stomacher), com 225 ml de caldo de enriquecimento para

Listeria desenvolvido por McCLAIN & LEE [38] (LEB, Oxoid), sem acriflavina, durante 2 min. Aliquotas de 1 ml (subdivididas em 0,3 + 0,3 + 0,3 + 0,1 ml) foram inoculadas superficialmente em placas contendo ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam (LPM, Difco), com incubação a 30°C/48h. A contagem de colônias típicas de *Listeria* foi realizada com o auxílio da iluminação a 45°, empregando-se iluminador (KL1500, Schott), espelho côncavo e microscópio estereoscópico (4752, Karl Zeiss).

A detecção da presença de *L. monocytogenes* através de enriquecimento seletivo, após adição de acriflavina (Sigma) à amostra remanescente e homogeneização durante 2 min, seguiu a metodologia recomendada por WARBURTON, FARBER, BABIUK [58], utilizando-se LPM (Difco) e ágar Oxford (Oxoid) modificado (MOX) para plaqueamento.

2.4 Preparo do Inóculo

Foi utilizada como inóculo uma mistura de cinco cepas de *L. monocytogenes* (*L.m.*): Scott A (sorovar 4b) e quatro cepas isoladas de carne bovina moída *L.m.* 259 (4b), *L.m.* 357 (1/2a), *L.m.* 374 (1/2a) e *L.m.* 410 (1/2a). Todas as cepas, avaliadas conforme recomendado por LOVETT & HITCHINS [37], apresentaram patogenicidade positiva em testes com camundongos. As culturas-estoque, mantidas a 4°C em tubos com ágar tripticase soja (Oxoid) inclinado contendo 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSA-YE), foram repicadas mensalmente a fim de manter a viabilidade das células.

As culturas foram ativadas mediante três transferências consecutivas para caldo tripticase soja (Oxoid) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSB-YE), a fim de se obter células na fase estacionária de crescimento. Após incubação a 35°C durante 15 horas, as suspensões foram centrifugadas (J2-21,

Beckman) a 5.500 x g a 4°C durante 15 min e lavadas duas vezes com tampão Butterfield. Em seguida, o sedimento final foi suspenso no mesmo diluente, de forma a se obter uma concentração de cerca de 10¹⁰ UFC/ml, conforme determinado em experimentos preliminares. Volumes iguais de cada cultura foram então misturados, efetuando-se a contagem através de inoculação superficial em placas contendo ágar triptose fosfato (TPA) (TPB, Difco; 2% de ágar, Merck) e incubação a 35°C/48h, antes e após a mistura.

2.5 Inoculação das Formulações e Preparo dos Hambúrgueres

Imediatamente após o preparo, a mistura de culturas de *L. monocytogenes* foi adicionada às formulações numa proporção de 1% (v/p), seguindo-se uma completa mistura manual, utilizando utensílios estéreis, e uma nova trituração, com a finalidade de promover uma distribuição homogênea do inóculo. Em seguida, porções de 113 g foram pesadas assépticamente e modeladas em modelador de hambúrguer (112 mm, Kurt Muller). Os hambúrgueres (112 mm de diâmetro e cerca de 13 mm de espessura) foram então colocados em bandejas estéreis e mantidos congelados em freezer a -18°C até o momento da fritura. A fim de permitir a introdução dos termopares, os hambúrgueres congelados foram perfurados radialmente até o centro geométrico com o auxílio de furadeira (Bosch) e broca estéril.

2.6 Fritura dos Hambúrgueres

Os hambúrgueres congelados, após introdução do termopar de cobre-constantan (tipo T) (TT-T-24, Omega Engineering, Inc.) foram submetidos a fritura em chapa elétrica (ED 36G, Garland) a 185 ± 5°C, sem adição de óleo,

seguindo um procedimento similar ao utilizado por TAMMINGA, BEUMER, KAMPELMACHER [53].

Os hambúrgueres foram fritos durante 2, 4, 6, 8 e 10 min, procedendo-se a viragem dos mesmos ao atingir a metade do tempo total. Oito hambúrgueres de cada formulação foram submetidos a fritura. Quatro hambúrgueres foram imediatamente resfriados após a fritura, enquanto outros quatro foram mantidos fora da chapa (à temperatura ambiente) durante 1 min, simulando assim o tempo de espera dos estabelecimentos comerciais.

O tempo de fritura foi monitorado com cronômetro. A temperatura do hambúrguer e da chapa durante a fritura foi monitorada com o auxílio de termopares conectados a um registrador de temperatura (H-92800-10, Cole Parmer), previamente programado para registrar a temperatura a cada intervalo de 10 s. Para a leitura da temperatura da chapa utilizou-se um termopar de superfície tipo T (H-08500-60, Cole Parmer). Os instrumentos de medida de temperatura foram aferidos com termômetros de bulbo de mercúrio (ASTM-USA), calibrados com padrões NIST ("National Institute of Standards and Technology"). A ordem de fritura dos hambúrgueres foi aleatória, uma vez que não foi possível processar simultaneamente as quatro formulações.

2.7 Contagem de *L. monocytogenes* nos Hambúrgueres

Após a fritura, os hambúrgueres foram colocados em sacos plásticos estéreis e imersos em banho de gelo. Em seguida, partindo-se da diluição inicial (1:3, p/v) em tampão Butterfield, foram preparadas diluições sucessivas no mesmo diluente, seguido de inoculação superficial em ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (TPAP) (TPB, Difco; 2% de ágar, Merck; piruvato de sódio, Merck) e em ágar triptose fosfato adicionado de 4% de NaCl (TPAS) (TPB, Difco; 2% de ágar, Merck; NaCl, Merck), com incubação das placas

a 35°C/48h. Todas as colônias típicas, observadas através de iluminação a 45°, foram consideradas *L. monocytogenes*. O mesmo método foi utilizado para análise dos hambúrgueres crus, após descongelamento a 4°C, no primeiro e no último dia de fritura.

A ocorrência de injúria na população de *L. monocytogenes* presente nos hambúrgueres crus e após fritura foi investigada através da comparação entre as contagens obtidas nos meios TPAS (meio seletivo) e TPAP (meio não seletivo).

Resultados obtidos em testes preliminares demonstraram que o processo de congelamento e o armazenamento congelado dos hambúrgueres durante 14 dias (período de tempo necessário para a realização dos experimentos de fritura) não exerciam influência significativa na população sobrevivente e não injuriada de *L. monocytogenes*.

2.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), complementando-se a análise com o teste de Duncan para comparação de médias. Em todos os testes foi considerado um nível de 5% de significância. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa STATISTICA 5.0 (StatSoft, Inc.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação Microbiológica dos Ingredientes

3.1.1 Carne

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos na avaliação microbiológica das porções de carne.

TABELA 1. Avaliação microbiológica das porções de carne com baixo e alto teor de gordura utilizadas no preparo das formulações de hambúrguer

Ensaio ^a	Tipo de Carne ^b	Microrg. Aeróbios Mesófilos (UFC/g)	<i>L. monocytogenes</i>	
			Contagem Direta (UFC/g)	Enriquecimento (presença em 25g)
2	CM	$8,63 \times 10^3$	< 10	c
	CG	$1,49 \times 10^4$	< 10	c
4	CM	$3,30 \times 10^3$	< 10	(-)
	CG	$1,25 \times 10^4$	< 10	(-)
6	CM	$1,00 \times 10^3$	< 10	(-)
	CG	$6,00 \times 10^3$	< 10	(-)
8	CM	$2,54 \times 10^4$	< 10	(-)
	CG	$2,93 \times 10^4$	< 10	(-)
10	CM	$3,65 \times 10^3$	< 10	(-)
	CG	$3,90 \times 10^3$	< 10	c

a: refere-se a fritura durante 2, 4, 6, 8 e 10 minutos

b: CM: carne com baixo teor de gordura (4,25 a 7,62% de gordura)

CG: carne com alto teor de gordura (20,82 a 39,37% de gordura)

c: foram isoladas colônias suspeitas

Observa-se que a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos variou de $1,00 \times 10^3$ a $2,54 \times 10^4$ UFC/g e de $3,90 \times 10^3$ a $2,93 \times 10^4$ UFC/g nas porções de carne com baixo e alto teor de gordura, respectivamente. Na análise para contagem direta de *L. monocytogenes* em LPM não foi observada nenhuma colônia típica, enquanto na detecção através de enriquecimento seletivo foram

isoladas colônias suspeitas em algumas porções de carne. Entretanto, devido à elevada população de *L. monocytogenes* ($>10^7$ UFC/g) inoculada nas formulações, a possível presença da bactéria (<10 UFC/g) nestas porções de carne foi desprezada. Assim, as colônias suspeitas não foram submetidas aos testes de identificação.

3.1.2 Proteína Texturizada de Soja

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos foi de $2,0 \times 10^1$ UFC/g. Na análise para detecção e contagem de *L. monocytogenes* não foi observada nenhuma colônia típica, tanto através de enriquecimento seletivo quanto na contagem direta em LPM.

3.2 Avaliação Físico-Química e Microbiológica das Formulações

3.2.1 Análises Físico-Químicas

Na *Tabela 2* são apresentados os resultados obtidos na análise físico-química das quatro formulações utilizadas no preparo dos hambúrgueres.

Pode-se observar que a formulação contendo PTS (F4) apresentou um valor de pH ligeiramente superior ao das demais formulações. A influência da adição de proteína texturizada de soja no pH da carne também foi observada por CRAVEN & BLANKENSHIP [12], que verificou que o aumento do pH dependia da quantidade de proteína adicionada. Os valores de A_w obtidos para F1, F2 e F4 não foram significativamente diferentes, enquanto que a formulação F3, devido à adição de NaCl, apresentou uma menor atividade de água. Também pode ser observado que os valores encontrados para lipídeos estão próximos dos teores pré-definidos.

TABELA 2. Características físico-químicas das formulações de hambúrguer^a

Ensaio ^b	Formulações ^c	pH	A _a	Umidade (%)	Lipídeos (%)	Proteínas (%)	Cinzas (%)
2	F1	5,68	0,992	70,58	8,89	18,23	0,89
	F2	5,72	0,993	62,31	19,27	17,23	0,81
	F3	5,68	0,981	69,41	9,03	18,47	2,33
	F4	5,87	0,994	69,90	9,14	18,82	1,00
4	F1	5,75	0,993	69,38	10,52	18,71	0,86
	F2	5,78	0,994	62,03	19,74	16,37	0,79
	F3	5,75	0,981	68,46	10,61	17,95	2,27
	F4	5,93	0,994	68,36	11,66	17,37	0,92
6	F1	5,66	0,993	70,86	9,10	18,84	0,93
	F2	5,59	0,993	62,87	18,85	16,75	0,80
	F3	5,61	0,983	69,28	9,48	17,72	2,29
	F4	5,83	0,993	68,83	10,71	17,63	1,00
8	F1	5,65	0,993	71,02	9,17	18,39	0,88
	F2	5,55	0,992	61,67	20,15	16,74	0,78
	F3	5,63	0,981	68,43	10,59	17,57	2,21
	F4	5,81	0,993	69,36	10,13	18,00	0,95
10	F1	5,61	0,992	70,09	9,21	19,17	0,90
	F2	5,61	0,993	62,49	18,58	17,33	0,80
	F3	5,60	0,982	69,01	9,32	18,40	2,34
	F4	5,80	0,993	69,93	9,11	18,55	1,02

a: valor médio de 3 amostras

b: refere-se a fritura durante 2, 4, 6, 8 e 10 minutos

c: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

3.2.2 Análises Microbiológicas

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos presentes nas formulações variou de $2,90 \times 10^3$ a $1,65 \times 10^5$ UFC/g para a F1, de $3,35 \times 10^3$ a

1,15 x 10⁵ UFC/g para F2, de 1,00 x 10³ a 7,05 x 10⁴ UFC/g para F3 e de 6,25 x 10³ a 3,15 x 10⁵ UFC/g para F4 (Tabela 3).

TABELA 3. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos nas formulações de hambúrguer

Ensaio ^a	Microrg. Aeróbios Mesófilos (UFC/g) Formulações ^b			
	F1	F2	F3	F4
2	2,90 x 10 ³	1,15 x 10 ⁵	9,20 x 10 ³	6,25 x 10 ³
4	5,30 x 10 ⁴	1,09 x 10 ⁴	7,05 x 10 ⁴	3,15 x 10 ⁵
6	1,65 x 10 ⁵	4,05 x 10 ⁴	1,00 x 10 ³	1,20 x 10 ⁴
8	1,24 x 10 ⁴	4,30 x 10 ⁴	1,55 x 10 ⁴	1,64 x 10 ⁴
10	8,85 x 10 ³	3,35 x 10 ³	6,95 x 10 ³	3,40 x 10 ⁴

a: refere-se a fritura durante 2, 4, 6, 8 e 10 minutos

b: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Os resultados obtidos demonstram, de um modo geral, pequenos aumentos da contagem, quando comparados com os valores apresentados na Tabela 1. Esses aumentos podem ser atribuídos à manipulação durante a mistura dos ingredientes, ao processo de trituração das formulações e à modelagem dos hambúrgueres.

3.3 Avaliação do Processo de Fritura dos Hambúrgueres

A utilização de carne submetida a tratamento térmico preliminar possibilitou a contagem de *L. monocytogenes* em TPAP, meio não seletivo que promove a recuperação de células injuriadas, com uma interferência não significativa da microbiota contaminante.

Os valores médios do $\log_{10}$ das contagens obtidas nos hambúrgueres crus e após fritura são apresentados na *Tabela 4*.

TABELA 4. Contagem ($\log_{10}$ UFC/g) da população total e não injuriada de *L. monocytogenes* em hambúrgueres crus e após fritura

Tempo de Fritura (min)	Form. ^a	Média (desvio padrão)					
		TPAP ^b (população total)			TPAS ^b (população não injuriada)		
		Cru ^c	Fritura ^d	Fritura + Espera ^d	Cru ^c	Fritura ^d	Fritura + Espera ^d
2	F1	7,40 (0,25)	7,27 (0,21)	7,11 (0,12)	7,36 (0,27)	7,11 (0,23)	7,05 (0,09)
	F2	7,44 (0,31)	7,35 (0,20)	7,33 (0,28)	7,47 (0,19)	7,31 (0,23)	7,21 (0,29)
	F3	7,42 (0,27)	7,49 (0,19)	7,27 (0,16)	7,46 (0,32)	7,36 (0,26)	7,22 (0,06)
	F4	7,64 (0,23)	7,49 (0,26)	7,33 (0,08)	7,51 (0,25)	7,42 (0,31)	7,13 (0,07)
4	F1	7,19 (0,18)	6,76 (0,08)	6,53 (0,16)	6,92 (0,22)	6,50 (0,05)	6,34 (0,17)
	F2	7,25 (0,21)	6,79 (0,24)	6,28 (0,08)	7,03 (0,31)	6,43 (0,20)	6,16 (0,03)
	F3	7,83 (0,21)	7,08 (0,10)	6,89 (0,12)	7,65 (0,25)	6,87 (0,14)	6,75 (0,20)
	F4	7,64 (0,09)	7,02 (0,19)	6,72 (0,26)	7,39 (0,12)	6,77 (0,25)	6,56 (0,30)
6	F1	7,11 (0,39)	5,10 (0,13)	4,31 (0,26)	7,04 (0,28)	4,54 (0,19)	3,73 (0,39)
	F2	7,25 (0,22)	4,53 (0,21)	4,17 (0,39)	7,29 (0,21)	4,31 (0,13)	3,94 (0,40)
	F3	7,63 (0,27)	5,71 (0,05)	4,78 (0,22)	7,60 (0,35)	5,45 (0,16)	4,40 (0,34)
	F4	7,35 (0,33)	5,10 (0,41)	4,50 (0,64)	7,33 (0,22)	4,88 (0,37)	4,35 (0,71)
8	F1	7,21 (0,07)	3,43 (0,24)	2,76 (0,47)	7,13 (0,04)	3,18 (0,23)	2,53 (0,32)
	F2	7,51 (0,11)	3,78 (0,47)	3,47 (0,23)	7,48 (0,21)	3,27 (0,59)	3,04 (0,34)
	F3	7,74 (0,16)	4,71 (0,05)	4,13 (0,17)	7,71 (0,18)	4,27 (0,18)	3,69 (0,17)
	F4	7,59 (0,18)	3,80 (0,33)	3,08 (0,48)	7,49 (0,16)	3,50 (0,36)	2,64 (0,35)
10	F1	7,45 (0,35)	2,17 (0,80)	0,68 (0,15)	7,36 (0,30)	1,75 (0,75)	0,60 (0,00)
	F2	7,44 (0,35)	2,98 (0,94)	2,06 (0,32)	7,39 (0,28)	2,68 (1,20)	1,31 (0,82)
	F3	7,76 (0,10)	3,99 (0,38)	3,55 (0,21)	7,70 (0,04)	3,42 (0,57)	2,91 (0,41)
	F4	7,75 (0,23)	1,80 (0,91)	1,27 (1,14)	7,73 (0,23)	1,29 (0,83)	1,02 (0,83)

a: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

b: TPAP: Ágar Triptose Fosfato (2% de ágar), adicionado de 1% de piruvato de sódio

TPAS: Ágar Triptose Fosfato (2% de ágar), adicionado de 4% de cloreto de sódio

c: valor médio de 2 amostras

d: valor médio de 4 amostras

Observa-se que a contagem da população total de *L. monocytogenes* (TPAP) nas amostras de hambúrguer congelado antes da fritura variou de 7,11 a 7,45 log₁₀ UFC/g para F1, de 7,25 a 7,51 log₁₀ UFC/g para F2, de 7,42 a 7,83 log₁₀ UFC/g para F3 e de 7,35 a 7,75 log₁₀ UFC/g para F4, demonstrando variação inferior a 0,5 ciclo na população inicial nos experimentos realizados a diferentes tempos de fritura. Resultado similar foi obtido para a população não injuriada (TPAS).

Pode ser verificado também, através dos desvios-padrão, uma pequena variabilidade na contagem de *L. monocytogenes* nas amostras de hambúrguer cru em função do tempo de armazenamento congelado, o que demonstra que a manutenção do hambúrguer sob congelamento não teve influência significativa sobre a população total (TPAP) e não injuriada (TPAS) da bactéria. A resistência de *L. monocytogenes* à morte e injúria pelo efeito do processo de congelamento e do armazenamento congelado também foi observada por PALUMBO & WILLIAMS [40] e GIANFRANCESCHI & AURELI [25] em carne bovina moída e hambúrguer, respectivamente.

Na *Tabela 4*, comparando-se as contagens obtidas nos meios TPAP e TPAS para os hambúrgueres após a fritura, pode ser observado que os valores são similares, e indicam que o processo de fritura, devido, talvez, à temperatura atingida e à sua curta duração, não promove injúria subletal nas células sobreviventes. Assim, apenas o efeito do processo de fritura sobre a população total (TPAP) de *L. monocytogenes* passou a ser considerado na discussão dos resultados.

As *Figuras 1 e 2* mostram o efeito da fritura (sem tempo de espera e com espera de 1 min, respectivamente) sobre a população de *L. monocytogenes* em hambúrgueres preparados com diferentes formulações.

Na fritura, seguida de imediato resfriamento (*Figura 1*), os valores médios obtidos para a redução da população foram da ordem de 2,01, 2,72, 1,92, 2,25 ciclos logarítmicos para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, após 6 min de processo. Após 8 min, a população foi reduzida em 3,78, 3,73, 3,03 e 3,79 ciclos logarítmicos, enquanto que após 10 min de fritura a redução obtida foi de 5,28, 4,46, 3,77 e 5,95 ciclos logarítmicos.

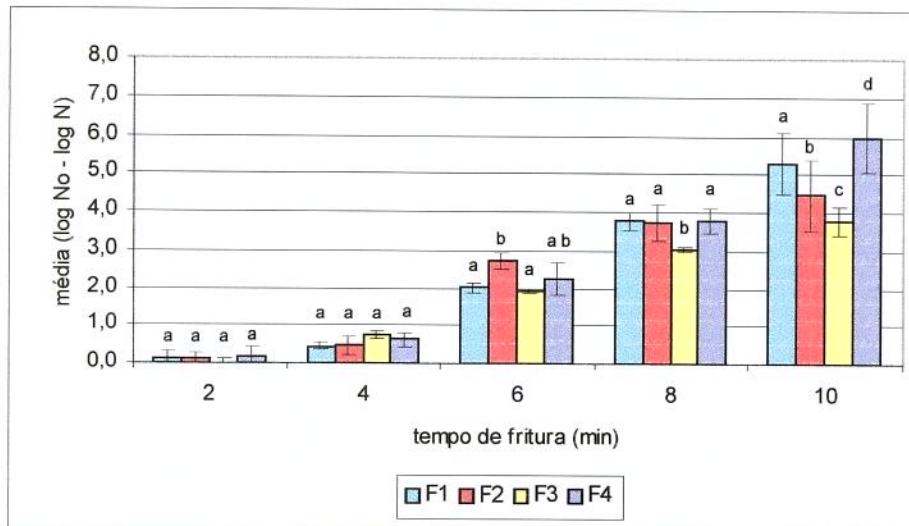


FIGURA 1. Redução da população de *L. monocytogenes* em hambúrgueres submetidos a fritura, seguida de imediato resfriamento

F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

a-d: para cada tempo de fritura, valores médios em colunas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

barras de erro representam os desvios padrão

N_0 : contagem da população inicial

N: contagem da população sobrevivente

No processo com tempo adicional de espera de 1 min (*Figura 2*), os valores médios encontrados para a redução da população foram da ordem de 2,80, 3,08, 2,85 e 2,85 ciclos logarítmicos para F1, F2, F3 e F4, respectivamente, após 6 min de fritura. Após 8 min, a redução foi de 4,45, 4,04, 3,61 e 4,51, enquanto que após 10 min a população foi reduzida em 6,77, 5,38, 4,21 e 6,48 ciclos logarítmicos.

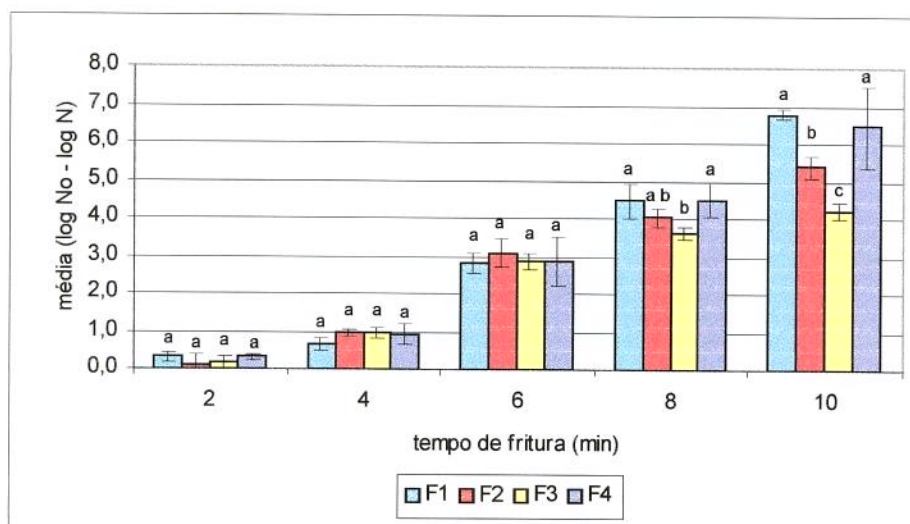


FIGURA 2. Redução da população de *L. monocytogenes* em hambúrgueres submetidos a fritura, seguida de tempo de espera de 1 min

F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

a-c: para cada tempo de fritura, valores médios em colunas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$)

barras de erro representam os desvios padrão

N_0 : contagem da população inicial

N : contagem da população sobrevivente

3.3.1 Influência dos Ingredientes

Na Figura 2, onde são apresentados os resultados obtidos nas condições que simulam o preparo do produto nos estabelecimentos comerciais, comparando-se a redução obtida para os hambúrgueres contendo 10% (F1) e 20% (F2) de gordura na fritura durante 8 e 10 minutos, pode ser verificado que os valores médios encontrados para F2 foram menores que para F1. Entretanto, a diferença entre as duas formulações foi significativa ($P < 0,05$) apenas no processo com 10 min de duração.

Segundo FAIN et al. [19], LINE et al. [35] e AHMED, CONNER, HUFFMAN [1], a gordura protege a célula bacteriana do efeito do calor. Eles verificaram em

carne bovina moída que o valor D para *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 aumentava com o aumento do teor de gordura. Esse mesmo efeito foi observado por FILPPI & BANWART [21] em carne moída inoculada com vírus. Entretanto, as condições de aquecimento utilizadas em experimentos de determinação do valor D diferem das condições empregadas na fritura dos hambúrgueres.

TAMMINGA, BEUMER, KAMPELMACHER [53], avaliando a sobrevivência de *Salmonella typhimurium* após a fritura de hambúrgueres contendo 15 e 30% de gordura, verificaram que não havia diferença significativa entre as populações sobreviventes nas duas formulações.

A fritura da formulação contendo 1,5% de sal (F3) durante 8 e 10 minutos promoveu uma menor redução da população de *L. monocytogenes*, quando comparada com F1 (Figura 2). A análise estatística dos resultados demonstrou a existência de diferença significativa ($P < 0,05$) entre essas duas formulações.

JORGENSEN, STEPHENS, KNOCHEL [31] constataram que a adição de 6,5% de NaCl à carne bovina moída aumentava o valor $D_{60^{\circ}\text{C}}$ para *L. monocytogenes* 2,6 vezes.

O efeito protetor do sal sobre *L. monocytogenes* também foi observado por YEN, SOFOS, SCHMIDT [59, 60]. Os autores verificaram, ao aquecer em banho-maria carne suína moída até uma temperatura interna de 60°C , que a destruição da bactéria diminuía com o aumento do teor de sal (1 a 3%) na carne. Entretanto, esse mesmo efeito não foi obtido no aquecimento até 65 e 68°C . Uma vez que não foi observada diferença na velocidade de penetração de calor entre as formulações, o efeito protetor do sal foi atribuído a alterações fisiológicas na própria célula bacteriana.

Na Figura 2 pode ser observado que as reduções obtidas para a formulação contendo 10% de gordura e 10,5% de PTS (F4), na fritura durante 8 e

10 min, são semelhantes às encontradas para F1, não havendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre elas.

CRAVEN & BLANKENSHIP [12] verificaram, em experimentos para determinação dos valores D , que a adição de proteína texturizada de soja à carne bovina moída protegeu *Salmonella* sp. do efeito do calor quando o pH da mistura (carne + PTS) foi igual ou superior a 6,1. Os valores de pH encontrados em nosso trabalho para a formulação F4 foram inferiores a 6,1; entretanto, como as condições de aquecimento são diferentes, não se pode atribuir ao pH a similaridade dos valores encontrados em F1 e F4.

Pesquisadores da Universidade Estadual de Kansas (EUA) verificaram que a adição de substitutos de gordura à carne pode proteger microrganismos patogênicos do efeito do calor. Observaram que o hambúrguer bovino contendo proteína de soja permitiu a sobrevivência de *E. coli* O157:H7 durante aquecimento até uma temperatura de 68,3°C [11].

3.3.2 Influência do Tempo de Fritura

Na *Figura 1* observa-se que, apesar do tempo de fritura de 4 min ter promovido uma certa redução da contagem, devido, provavelmente à fritura da camada externa, somente a partir de 6 min é que o efeito da fritura sobre a população de *L. monocytogenes* passou a ser mais intenso.

Além disso, comparando-se os valores apresentados nas *Figuras 1* e *2*, pode ser observado que o tempo de espera de 1 min aumentou a letalidade do processo de fritura. Segundo JUNEJA et al. [32], devido ao calor latente, o cozimento dos hambúrgueres continua durante um curto intervalo de tempo após remoção da chapa. A importância do tempo de espera também foi verificada por SULLIVAN et al. [50] e TAMMINGA, BEUMER, KAMPELMACHER [53].

As curvas de sobrevivência obtidas para *L. monocytogenes* evidenciaram a existência de relação linear entre o valor médio do $\log_{10}$ dos sobreviventes e o tempo de fritura entre 2 e 10 min. Os resultados da análise de regressão linear dos dados são apresentados na *Tabela 5*.

TABELA 5. Análise de regressão linear das curvas de sobrevivência de *L. monocytogenes* em hambúrgueres submetidos a fritura durante 2 a 10 min

Formulação ^a		Equação de Regressão $y = y_0 - \alpha t$	Coef. Angular $p/y_0 = 1$	Valor R^2
F1	Fritura	$y = 9,005 - 0,6765x$	- 0,0751	0,9779
	Fritura+Espera	$y = 9,267 - 0,8315x$	- 0,0897	0,9758
F2	Fritura	$y = 8,611 - 0,5875x$	- 0,0682	0,9535
	Fritura+Espera	$y = 8,667 - 0,6675x$	- 0,0770	0,9809
F3	Fritura	$y = 8,607 - 0,4685x$	- 0,0544	0,9791
	Fritura+Espera	$y = 8,384 - 0,5100x$	- 0,0608	0,9366
F4	Fritura	$y = 9,422 - 0,7300x$	- 0,0775	0,9706
	Fritura+Espera	$y = 9,308 - 0,7880x$	- 0,0847	0,9796

a: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de NaCl

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

O aumento da letalidade com o aumento do tempo de processo também foi observado por outros autores, e é atribuído ao fato de que temperaturas mais elevadas são obtidas em tratamentos térmicos mais prolongados [32, 34, 53].

KOTULA et al. [34] observaram que a população de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrófilos diminuiu com o aumento do tempo de fritura. Na fritura durante 8 minutos uma redução de cerca de 6 ciclos logarítmicos foi obtida. DAVIDSON & WITTY [14] não conseguiram isolar *Salmonella* em hambúrgueres inoculados com cerca de 10^2 UFC/g após fritura por 10 min. Segundo os autores,

seriam necessários 6 min para reduzir a população em um ciclo logarítmico. TAMMINGA, BEUMER, KAMPELMACHER [53], por sua vez, utilizando hambúrguer inoculado com *S. typhimurium*, submetidos a fritura em chapa elétrica comercial, obtiveram uma redução de 2 e 3 ciclos logarítmicos, respectivamente, após 4,8 e 6,4 minutos.

Segundo HAGUE et al. [28], o tempo de aquecimento necessário para obtenção de um produto seguro depende de vários fatores, inclusive do tamanho e grau de compactação do hambúrguer, teor de gordura e presença de outros ingredientes, aquecimento a partir do estado congelado, descongelado ou refrigerado, temperatura inicial do produto antes do aquecimento, número de viragens, método de aquecimento e temperatura da fonte de calor. Assim, como as condições utilizadas em nosso trabalho são diferentes das condições empregadas por autores de trabalhos citados na literatura, não é possível fazer uma comparação baseada no tempo de aquecimento.

Na *Tabela 5*, os coeficientes angulares, obtidos após normalização para uma população inicial de *L. monocytogenes* igual a 10 UFC/g ($y_0 = 1$), evidenciam uma menor taxa de letalidade do processo de fritura para a formulação F3. Considerando-se o processo com tempo adicional de espera de 1 min, pode ser visualizado na *Figura 2* que a fritura da formulação F3 durante 10 minutos promoveu uma letalidade de 4,21 ciclos logarítmicos, inferior, portanto, à letalidade recomendada pelo USDA (5D). A redução da população nas demais formulações foi superior a 5 ciclos logarítmicos.

3.3.3 Influência da Temperatura Final dos Hambúrgueres

As temperaturas dos hambúrgueres ao final do tempo de fritura são apresentadas na *Tabela 6*. Observa-se, através dos desvios-padrão, uma grande variabilidade das temperaturas, o que não permite tirar conclusões sobre a existência de relação entre a temperatura interna final e a redução da população de *L. monocytogenes*.

TABELA 6. Temperatura interna dos hambúrgueres ao final do tempo de fritura

Tempo de Fritura (min)	Temperatura ^a (°C)			
	Formulações ^b			
	F1	F2	F3	F4
2	39,4 (9,1) ^c	32,4 (10,6)	28,6 (3,6)	32,2 (7,1)
4	62,5 (2,4)	67,3 (13,4)	53,0 (6,7)	65,6 (4,9)
6	75,7 (4,8)	83,6 (6,1)	80,8 (3,4)	94,6 (3,8)
8	88,9 (7,6)	89,8 (7,5)	78,5 (8,6)	85,2 (8,4)
10	92,4 (7,6)	90,8 (5,9)	87,7 (8,5)	86,5 (8,0)

a: valor médio de 8 amostras

b: F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de sal

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

c: desvio padrão entre parênteses

A temperatura interna final do hambúrguer, medida com instrumento preciso, é considerada o indicador mais seguro do aquecimento adequado do produto [28, 32, 36].

HAGUE et al. [28] verificaram que o tempo de aquecimento apresentava um alta correlação ($R^2=0,96$) com a temperatura final do produto, medida no centro geométrico. Entretanto, no trabalho realizado por DAVIDSON & WITTY [14] observou-se uma grande variação da temperatura interna final, o que foi atribuído, principalmente, à dificuldade em manter o termopar no centro do hambúrguer

durante o aquecimento. LIU & BERRY [36], por sua vez, também constataram esta variabilidade da temperatura quando hambúrgueres contendo 10 e 20% de gordura foram fritos durante um tempo constante.

Segundo JIANG [30] é difícil monitorar a temperatura durante o aquecimento do hambúrguer. O autor avaliou o perfil de temperatura durante o tratamento térmico e observou que o produto nem sempre atinge a temperatura máxima ao final do aquecimento, de forma que a temperatura interna máxima pode ser atingida em tempos diferentes durante e após o processo, comportamento que pode ser atribuído à heterogeneidade do produto.

Essa variabilidade na distribuição da temperatura dentro dos hambúrgueres tem levado diversos pesquisadores a efetuarem a leitura em mais de um ponto durante o aquecimento, considerando como “temperatura interna final” a menor temperatura obtida [29, 32].

Segundo SINGH [48], durante a fritura de hambúrgueres, a transferência de calor se processa por condução, convecção e radiação. Enquanto a transferência de calor interna é devida principalmente à condução, a convecção e radiação são importantes para o aquecimento da superfície do produto. Uma vez que o processo de fritura em chapa envolve o uso de temperaturas relativamente altas, o mecanismo de aquecimento envolve inicialmente a formação de uma crosta com baixa umidade e uma parte interna com alta umidade. A água evapora na interface entre a crosta e a região interna e, à medida em que a fritura se processa, esta interface se movimenta em direção ao centro do hambúrguer. Esta interface é crítica e influi na temperatura final do centro geométrico do produto. Quando hambúrgueres congelados são fritos, existe uma interface adicional, que define a fronteira das regiões congeladas e não congeladas.

Assim, a variação da temperatura interna final dos hambúrgueres observada neste trabalho pode ser atribuída, em parte, à dificuldade em manter o termopar na posição central durante o processo de fritura. Entretanto, essa variação parece ser inerente ao produto, devido à sua heterogeneidade, podendo ser devida também aos complexos mecanismos de transferência de calor envolvidos no processo de fritura.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a adição de 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada não teve influência na letalidade do processo de fritura para *L. monocytogenes* em hambúrguer, quando comparado com o produto contendo 10% de gordura. Entretanto, a adição de 1,5% de NaCl promoveu uma redução da letalidade do processo, principalmente na fritura durante 8 e 10 min. Os resultados obtidos com a formulação contendo 20% de gordura, por sua vez, não permitem fazer afirmações conclusivas sobre a influência deste componente.

Observou-se também a existência de relação linear entre o tempo de fritura e a sobrevivência de *L. monocytogenes* em hambúrguer. Entretanto, não se recomenda a utilização do tempo de fritura como indicador da eficiência do tratamento térmico, uma vez que a influência de vários fatores relacionados com as características físicas e químicas do produto, assim como as condições operacionais do processo, podem determinar variações no tempo necessário para obtenção de produtos seguros.

O tempo de espera após a fritura promoveu aumento da letalidade do processo. A fritura dos hambúrgueres durante 10 min, seguida de tempo de espera, promoveu uma redução da população de *L. monocytogenes* superior a 5

ciclos logarítmicos para as formulações contendo 10% de gordura (F1), 20% de gordura (F2) e 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja (F4). Na formulação contendo 10% de gordura e 1,5% de NaCl (F3) uma redução de 4,21 ciclos logarítmicos foi obtida, inferior, portanto, à letalidade recomendada pelo USDA (5D) para o tratamento térmico de hambúrguer.

A grande variabilidade observada na temperatura interna ao final da fritura indica que o cozimento do hambúrguer não se processa de forma uniforme. Assim, o estabelecimento de medidas de controle do processo de fritura, baseado na temperatura interna, pode não ser suficiente para a garantia da segurança do produto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AHMED, N.M.; CONNER, D.E.; HUFFMAN, D.L. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. **Journal of Food Science**, Chicago, v.60, n.3, p.606-610, May/June, 1995.
- [2] ALMEIDA, R.C.C. **Aspectos microbiológicos e químicos de produtos alimentícios elaborados com carnes moídas, vendidos no varejo no município de Campinas**. Campinas, 1983. 103p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- [3] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14 ed. Arlington, 1984. 1141p.
- [4] BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
- [5] BRACKETT, R.E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.162-164, 178, Apr., 1988.
- [6] CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers- western United States, 1992-1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.42, n.14, p.258-263, Apr., 1993.

- [7] CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to home-cooked hamburger-California, july 1993. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.43, n.12, p.213-216, Apr., 1994.
- [8] CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers -Colorado, 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v.46, n.33, p.777-778, Aug., 1997.
- [9] COELHO, M.S.L.; BARBOSA, D.F. Estudo comparativo da qualidade microbiológica de hambúrgueres processados artesanal e industrialmente. **Revista Ceres**, Viçosa, v.40, n.229, p.235-241, maio/jun., 1993.
- [10] COMI, G.; FRIGERIO, R.; CANTONI, C. *Listeria monocytogenes* serotypes in italian meat products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.15, n.4, p.168-171, Oct., 1992.
- [11] Cooked color deceptive in fat-replaced beef patties. **Food Chemical News**, Washington, v.37, n.19, p.8-9, July, 1995.
- [12] CRAVEN, S.E.; BLANKENSHIP, L.C. Increased heat resistance of salmonellae in beef with added soy proteins. **Journal of Food Protection**, Ames, v.46, n.5, p.380-384, May, 1983.
- [13] CROSS, H.R.; STANFIELD, M.S.; GREEN, E.C.; HEINEMEYER, J.M.; HOLLICK, A.B. Effect of fat and textured soy protein content on consumer acceptance of ground beef. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, n.6, p.1331-1332, Nov.-Dec., 1975.

- [14] DAVIDSON, C.M.; WITTY, J.K. Fate of salmonellae in vacuum-packaged ground meat during storage and subsequent cooking. **Journal of the Canadian Institute of Food Science and Technology**, Ottawa, v.10, n.3, p.223-225, July, 1997.
- [15] DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v.2, n.2, p.110-112, Apr., 1991.
- [16] DITSCHAEVER, C.L.; ARNOTT, D.R.; BULLOCK, D.H. Bacteriological quality of raw refrigerated ground beef. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.36, n.7, p.375-377, July, 1973.
- [17] DITSCHAEVER, C.L.; BULLOCK, D.H., ARNOTT, D.R. Bacteriological evaluation of retail ground beef, frozen beef patties, and cooked hamburger. **Journal of Food Protection**, Ames, v.40, n.6, p.378-381, June, 1977.
- [18] EGBERT, W.R.; HUFFMAN, D.L.; CHEN, C-M.; DYLEWSKI, D.P. Development of low-fat ground beef. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.6, p.64-73, June, 1991.
- [19] FAIN, A.R., Jr.; LINE, J.E.; MORAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.; CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A: D-value e z-value determinations in ground beef and turkey. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.10, p.756-761, Oct., 1991.
- [20] FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v.55, n.3, p.476-511, Sept., 1991.

- [21] FILPPI, J.A.; BANWART, G.J. Effect of the fat content of ground beef on the heat inactivation of poliovirus. **Journal of Food Science**, Chicago, v.39, n.5, p.865-868, Sept./Oct., 1974.
- [22] FONTAINE, R.E.; ARNON, S.; MARTIN, W.T.; VERNON, T.M., Jr.; GANGAROSA, E.J.; FARMER, J.J., III; MORAN, A.B.; SILLIKER, J.H.; DECKER, D.L. Raw hamburger: an interstate common source of human salmonellosis. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.107, n.1, p.36-45, Jan., 1978.
- [23] FRASER, J.S. The enforcement of microbiological standards for foods: its effects on industry and food quality in New Zealand. **Food Technology in Australia**, Sydney, v.29, n.4, p.138-141, Apr., 1977.
- [24] Frozen, raw beef patties for food service. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, Des Moines, v.17, n.7, p.427-431, July, 1997.
- [25] GIANFRANCESCHI, M.; AURELI, P. Freezing and frozen storage on the survival of *Listeria monocytogenes* in different foods. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v.8, n.4, p.303-309, 1996.
- [26] GIESE, J. Developing low-fat meat products. **Food Technology**, Chicago, v.46, n.4, p.100-108, Apr., 1992.
- [27] GILL, C.O.; RAHN, K.; SLOAN, K.; McMULLEN, L.M. Assessment of the hygienic performances of hamburger patty production processes. **International Journal of Food Microbiology**, Oxford, v.36, n.2-3, p.171-178, May, 1997.

- [28] HAGUE, M.A.; WARREN, K.E.; HUNT, M.C.; KROPF, D.H.; KASTNER, C.L.; STRODA, S.L.; JOHNSON, D.E. Endpoint temperature, internal cooked color, and expressible juice color relationships in ground beef patties. **Journal of Food Science**, Chicago, v.59, n.3, p.465-470, May-June, 1994.
- [29] JACKSON, T.C.; HARDIN, M.D.; ACUFF, G.R. Heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in a nutrient medium and in ground beef patties as influenced by storage and holding temperatures. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.3, p.230-237, Mar., 1996.
- [30] JIANG, C. Temperature profiles during ground beef patty cooking. In: IFT ANNUAL MEETING. 1996, New Orleans. **Book of Abstracts**. Chicago: IFT, 1996. p.169.
- [31] JORGENSEN, F.; STEPHENS, P.J.; KNOCH, S. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.3, p.274-281, Sept., 1995.
- [32] JUNEJA, V.K.; SNYDER, O P., Jr., WILLIAMS, A.C.; MARMER, B.S. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburger. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.10, p.1163-1166, Oct., 1997.
- [33] KARCHES, H.; TEUFEL, P. *Listeria monocytogenes* - vorkommen in hackfleisch und verhalten in frischer zwiebelmettwurst. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.68, n.11, p.1388-1392, 1420, Nov., 1988.
- [34] KOTULA, A.W.; CHESNUT, C.M.; EMSWILER, B.S.; YOUNG, E.P. Destruction of bacteria in beef patties by cooking. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.45, n.1, p.54-58, July, 1977.

- [35] LINE, J.E.; FAIN, A.R., Jr.; MORAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.; CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and z-value determinations in ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.10, p.762-766, Oct., 1991.
- [36] LIU, M.N.; BERRY, B.W. Variability in color, cooking times, and internal temperature of beef patties under controlled cooking conditions. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, n.9, p.969-975, Sept., 1996.
- [37] LOVETT, J.; HITCHINS, A.D. *Listeria* isolation. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**. 6 ed. (Suppl.) 2nd printing (2/89). Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1989. Chap. 29, p.29.01-29.14.
- [38] McCLAIN, D.; LEE, W.H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v.71, n.3, p.660-664, May-June, 1988.
- [39] ORTA-RAMIREZ, A.; PRICE, J.F.; HSU, Y-C.; VEERAMUTHU, G.J.; CHERRY MERRITT, J.S.; SMITH, D.M. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella senftenberg*, and enzymes with potential as time-temperature indicators in ground beef. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.60, n.5, p.471-475, May, 1997.
- [40] PALUMBO, S.A.; WILLIAMS, A.C. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. **Food Microbiology**, London, v.8, n.1, p.63-68, Mar., 1991.

- [41] POETA, A.; POSSIDENTE, R.; GIACCONE, V. Indagine sull'inquinamento microbiologico di carni fresche e utensili in macelleria. **Industrie Alimentari**, Pinerolo, v.32, n.321, p.1200-1205, dic., 1993.
- [42] RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; McGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S. JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.308, n.12, p.681-685, Mar., 1983.
- [43] ROSSI, O.D., Jr.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; NADER, A., F°. Análise bacteriológica de carnes de "hamburger" de fabricação industrial e caseira, comercializados em Jaboticabal/SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.37, n.3, p.265-279, Jun., 1985.
- [44] RYAN, C.A.; TAUXE, R.V.; HOSEK, G.W.; WELLS, J.G.; STOEZ, P.A.; McFADDEN, H.W., Jr.; SMITH, P.W.; WRIGHT, G.F.; BLAKE, P.A. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.154, n.4, p.631-638, Oct., 1986.
- [45] SCHOENI, J.L.; BRUNNER, K.; DOYLE, M.P. Rates of thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beef and fermented beaker sausage. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.5, p.334-337, May, 1991.
- [46] SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA (SNDA). Regula o emprego de soja texturizada. Portaria nº 115 de 25 jul. 1978. **Diário Oficial**, República Federativa do Brasil, Brasília, 01 ago. 1978.

- [47] SHERIDAN, J.J.; DUFFY, G.; McDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S. The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.22, n.2-3, p.105-113, May, 1994.
- [48] SINGH, R.P. Heat transfer in beef patties during cooking. In: IFT ANNUAL MEETING. 1996, New Orleans. **Book of Abstracts**. Chicago: IFT, 1996. p.168.
- [49] SKOVGAARD, N.; MORGEN, C.A. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, n.3, p.229-242, May, 1988.
- [50] SULLIVAN, R.; MARNELL, R.M.; LARKIN, E.P.; READ, R.B.Jr. Inactivation of poliovirus 1 and coxsackievirus B-2 in broiled hamburgers. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.38, n.8, p.473-475, Aug., 1975.
- [51] SURKIEWICZ, B.F.; HARRIS, M.E.; ELLIOTT, R.P.; MACALUSO, J.F.; STRAND, M.M. Bacteriological survey of raw beef patties produced at establishments under federal inspection. **Applied Microbiology**, Washington, v.29, n.3, p.331-334, Mar., 1975.
- [52] SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JOHNSON, M.G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F., ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington, American Public Health Association, 1992. chap. 4, p. 75-95.

- [53] TAMMINGA, S.K.; BEUMER, R.R.; KAMPELMACHER, E.H. Microbiological studies on hamburgers. **Journal of Hygiene**, London, v.88, n.1, p.125-142, Feb., 1982.
- [54] TORNER, M.J.; CASTILLO, M.; PLÁ, S.; HERNANDORENA, M.J. Estudio de la calidad sanitaria de productos cárnicos frescos elaborados en carnicerías-salchicherías del área de salud de Xátiva. **Alimentaria**, Madrid, v.33, n.262, p.27-31, mayo, 1995.
- [55] TROUTT, E.S.; HUNT, M.C.; JOHNSON, D.E.; CLAUS, J.R.; KASTNER, C.L.; KROPF, D.H. Characteristics of low-fat ground beef containing texture-modifying ingredients. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.1, p.19-24, Jan.-Feb., 1992a.
- [56] TROUTT, E.S.; HUNT, M.C.; JOHNSON, D.E.; CLAUS, J.R.; KASTNER, C.L.; KROPF, D.H.; STRODA, S. Chemical, physical, and sensory characterization of ground beef containing 5 to 30 percent fat. **Journal of Food Science**, Chicago, v.57, n.1, p.25-29, Jan.-Feb., 1992b.
- [57] TRUSCOTT, R.B.; MCNAB, W.B. Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. **Journal of Food Protection**, Ames, v.51, n.8, p.626-628, 638, Aug., 1988.
- [58] WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: Canada. Health and Welfare. **Compendium of analytical methods**: laboratory procedures of microbiological analysis of foods. Ottawa: Polyscience, 1991. v.3. [MFHPB 30]

- [59] YEN, L.C.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Effect of meat curing ingredients on thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.6, p.408-412, June, 1991.
- [60] YEN, L.C.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in ground pork with water, sodium chloride and other curing ingredients. **Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie**, London, v.25, n.1, p.61-65, Feb., 1992.

CONCLUSÕES GERAIS

O procedimento utilizado para redução da contaminação inicial da carne mostrou ser eficiente, e possibilitou a contagem de *Listeria monocytogenes* em ágar triptose fosfato adicionado de 1% de piruvato de sódio (TPAP), meio de cultura não seletivo que permite a recuperação de células injuriadas pelo calor, sem uma interferência significativa da microbiota contaminante.

Os resultados obtidos nos experimentos de determinação da resistência térmica de *L. monocytogenes* em formulações para hambúrguer bovino mostraram que o meio de cultura empregado na contagem da população sobrevivente exerceu influência nos valores *D*, principalmente a 55,0°C, temperatura em que os valores obtidos com TPAP foram até 1,6-1,7 vezes superiores aos encontrados com ágar cloreto de lítio feniletanol (LPM).

Observou-se também que o aumento de 10 pontos percentuais no teor de gordura da carne e a adição de 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada não tiveram influência na resistência térmica da bactéria. Entretanto, a adição de 1,5% de cloreto de sódio promoveu um aumento na resistência térmica a 55,0 e 60,0°C da ordem de 1,7 e 1,5 vezes, respectivamente.

Estes resultados enfatizam a importância da escolha de um meio de cultura adequado para os estudos de resistência térmica de *L. monocytogenes* e, possivelmente, de outros microrganismos. Além disso, eles demonstram que o efeito do cloreto de sódio na resistência térmica da bactéria deve ser considerado no estabelecimento de tratamentos térmicos seguros para produtos cárneos contendo este ingrediente, principalmente quando são utilizadas temperaturas de aquecimento entre 55 e 60°C.

Os resultados obtidos nos experimentos de fritura dos hambúrgueres demonstraram que a adição de 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

não teve influência na letalidade do processo de fritura para *L. monocytogenes* em hambúrguer, quando comparado com o produto contendo 10% de gordura. Entretanto, a adição de 1,5% de NaCl promoveu uma redução da letalidade do processo, principalmente na fritura durante 8 e 10 minutos. Os resultados obtidos com a formulação contendo 20% de gordura, por sua vez, não permitiram fazer afirmações conclusivas sobre a influência deste componente.

Observou-se também a existência de uma relação linear entre o tempo de fritura e a sobrevivência de *L. monocytogenes* em hambúrguer. Entretanto, não se recomenda a utilização do tempo de fritura como indicador da eficiência do tratamento térmico, uma vez que a influência de vários fatores relacionados com as características físicas e químicas do produto, assim como com as condições operacionais do processo podem determinar variações no tempo necessário para obtenção de produtos seguros.

O tempo de espera após a fritura promoveu um aumento da letalidade do processo. A fritura dos hambúrgueres durante 10 minutos, seguida de tempo de espera, promoveu uma redução da população de *L. monocytogenes* superior a 5 ciclos logarítmicos para as formulações contendo 10% de gordura (F1), 20% de gordura (F2) e 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja (F4). Na formulação contendo 10% de gordura e 1,5% de NaCl (F3) uma redução de 4,21 ciclos logarítmicos foi obtida; inferior, portanto, à letalidade recomendada (5D) pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) para o tratamento térmico de hambúrguer.

A grande variabilidade observada na temperatura interna ao final da fritura indica que o cozimento do hambúrguer não se processa de forma uniforme. Assim, o estabelecimento de medidas de controle do processo de fritura, baseado na temperatura interna, pode não ser suficiente para a garantia da segurança do produto.

Apesar das hipóteses existentes sobre o mecanismo pelo qual o cloreto de sódio protege a célula microbiana do efeito do calor, estudos mais profundos e conclusivos devem ser realizados, tendo em vista que esse sal é freqüentemente utilizado como ingrediente em diferentes tipos de alimentos.

I. ILUSTRAÇÕES GERAIS DOS PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS EMPREGADAS NOS EXPERIMENTOS

I.1 Procedimento para Redução da Contaminação e Preparo da Carne Fresca



FIGURA 1. Imersão da carne em água fervente



FIGURA 2. Remoção da carne da água fervente

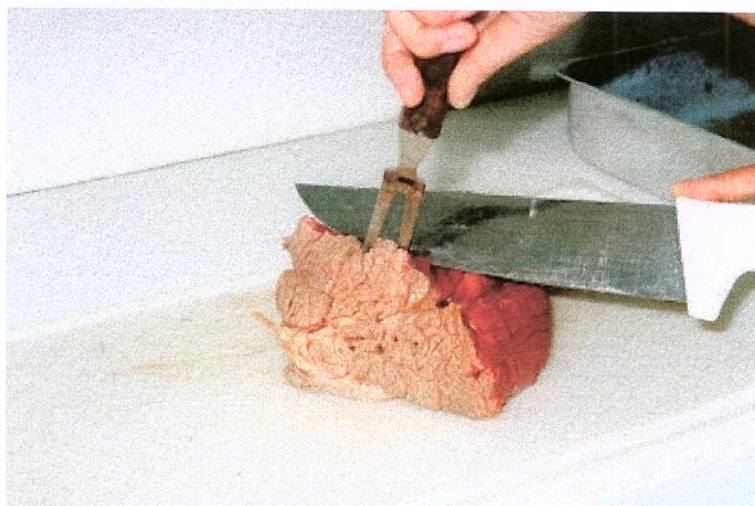


FIGURA 5. Remoção da camada externa da carne

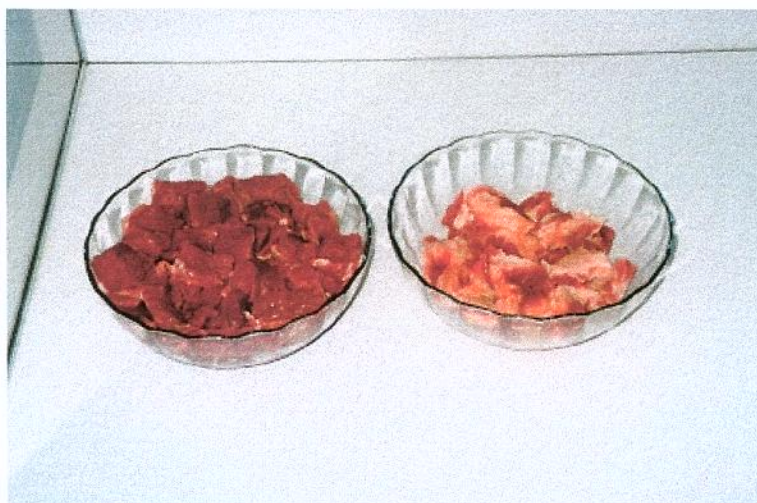


FIGURA 6. Porções de carne com baixo e alto teor de gordura



FIGURA 7. Trituração da carne com baixo teor de gordura

I.2 Estudo da Influência do Meio de Cultura Empregado na Contagem da População Sobrevivente e do Teor de Gordura, Cloreto de Sódio e Proteína Texturizada de Soja na Resistência Térmica de *Listeria monocytogenes* em Formulações para Hambúrguer

I.2.1 Determinação do Tempo “Lag” de Aquecimento

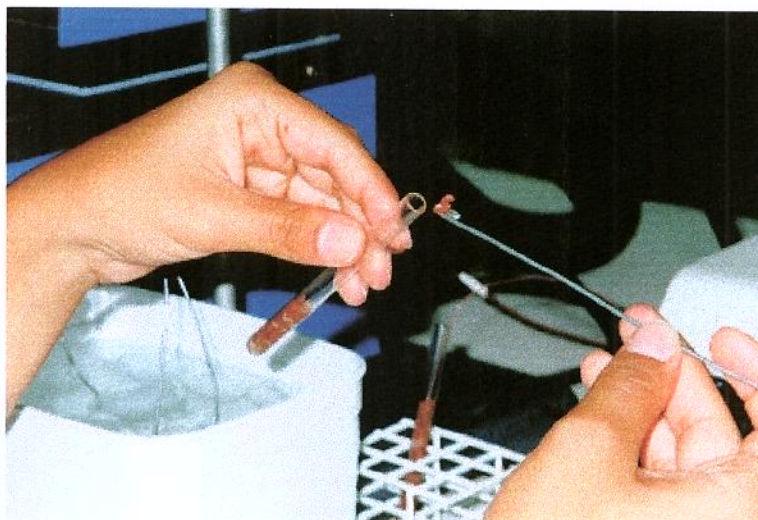


FIGURA 8. Acondicionamento da formulação de hambúrguer no tubo TDT

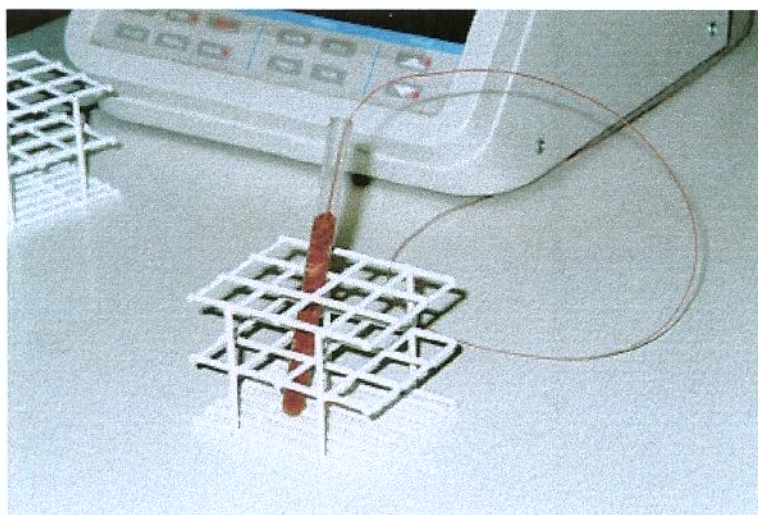


FIGURA 9. Formulação de hambúrguer com termopar inserido no centro geométrico

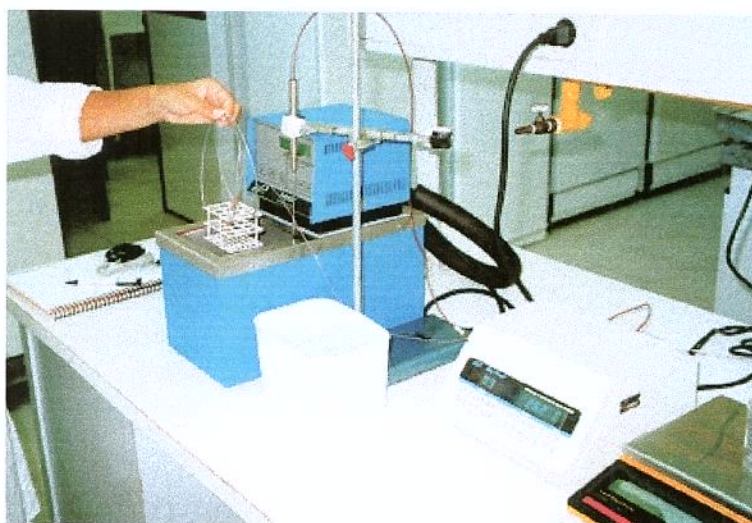


FIGURA 10. Equipamentos e utensílios utilizados nos experimentos

I.2.2 Determinação dos Valores D e z para *L. monocytogenes* nas Formulações de Hambúrguer



FIGURA 11. Inoculação de *L. monocytogenes* na formulação de hambúrguer



FIGURA 12. Acondicionamento da formulação de hambúrguer no tubo TDT



FIGURA 13. Pesagem da formulação de hambúrguer contida no tubo TDT

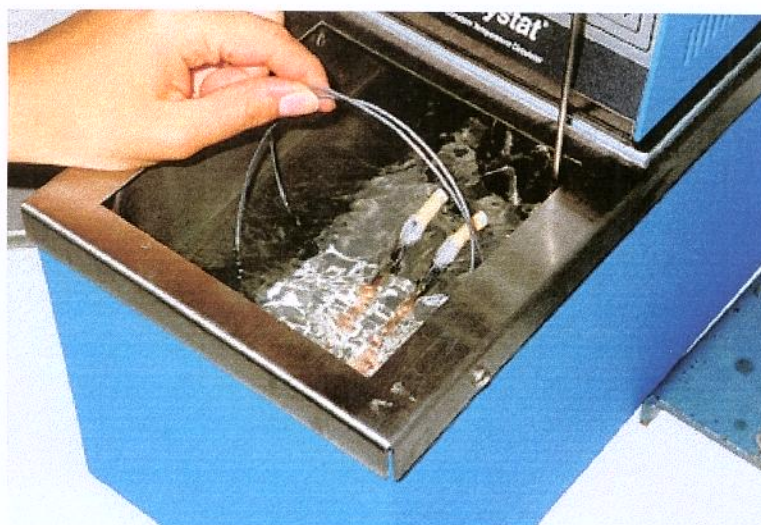


FIGURA 14. Tratamento térmico da formulação de hambúrguer inoculada

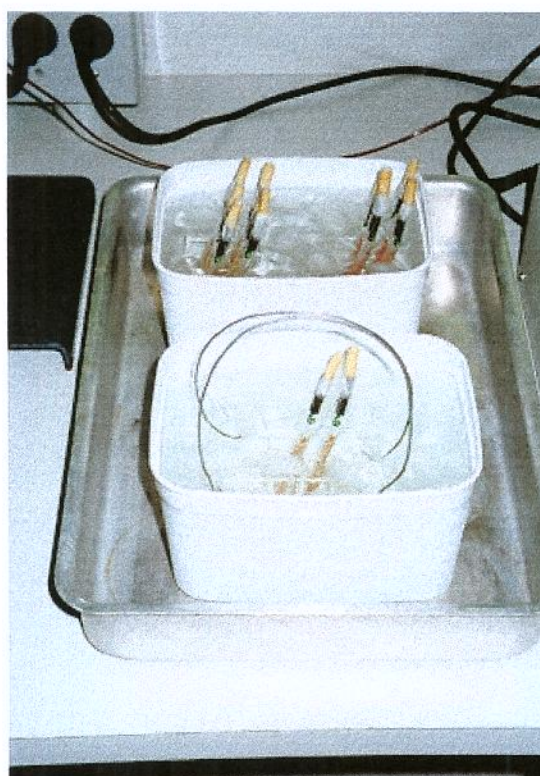


FIGURA 15. Resfriamento da formulação de hambúrguer após o tratamento térmico

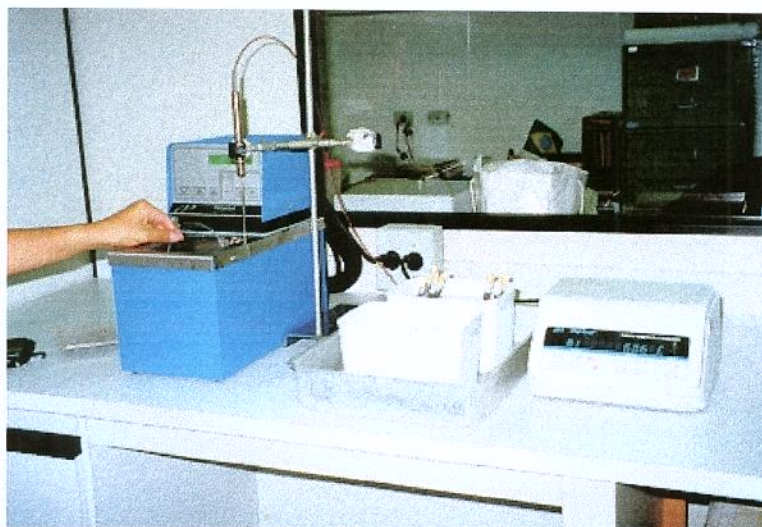


FIGURA 16. Equipamentos e instrumentos utilizados no tratamento térmico



FIGURA 17. Remoção da formulação de hambúrguer do tubo TDT após o tratamento térmico

I.3. Estudo da Influência dos Ingredientes, Tempo de Fritura e Temperatura Final dos Hambúrgueres na Injúria e Destruição de *Listeria monocytogenes*



FIGURA 18. Pesagem da formulação inoculada e modelagem do hambúrguer

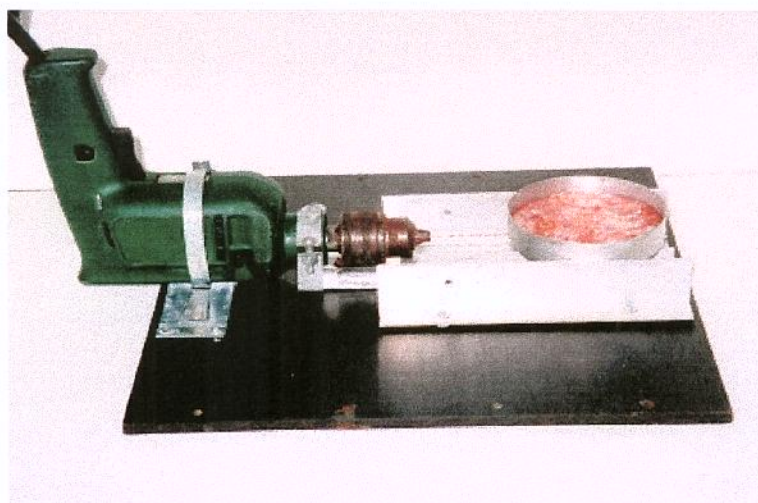


FIGURA 19. Perfuração do hambúrguer

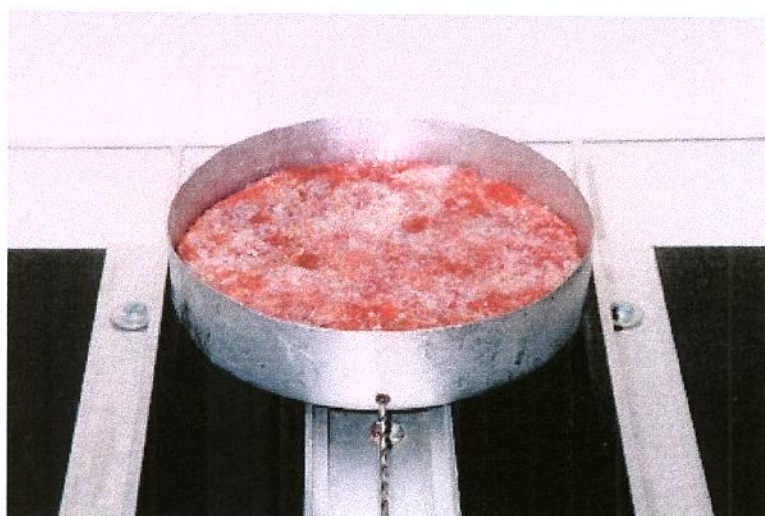


FIGURA 20. Detalhe da perfuração do hambúrguer

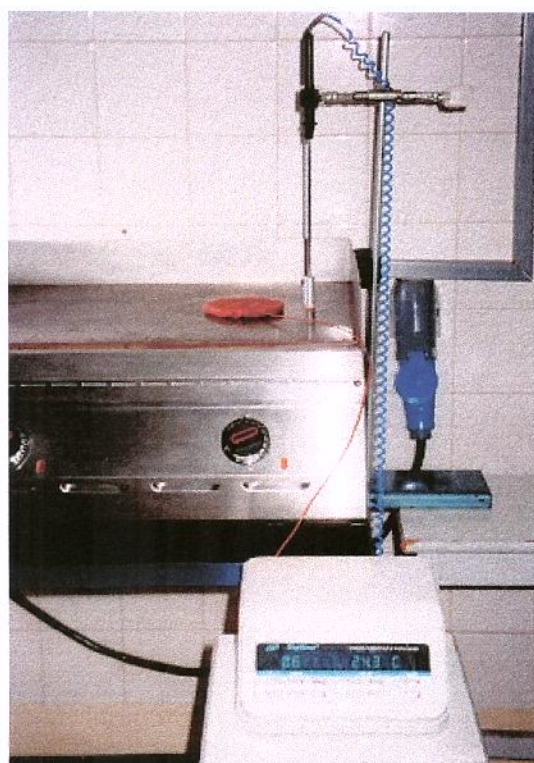


FIGURA 21. Equipamentos e instrumentos utilizados na fritura do hambúrguer

II. DETERMINAÇÃO DO TEMPO “LAG” DE AQUECIMENTO PARA AS FORMULAÇÕES DE HAMBÚRGUER

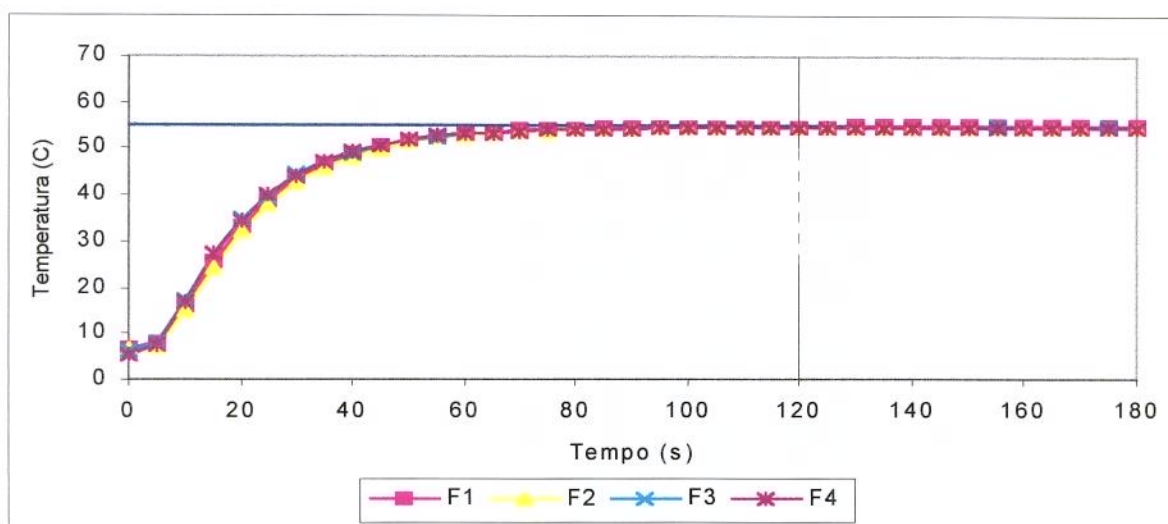


FIGURA 22. Perfil de penetração de calor nas formulações de hambúrguer durante aquecimento a 55,0°C

F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

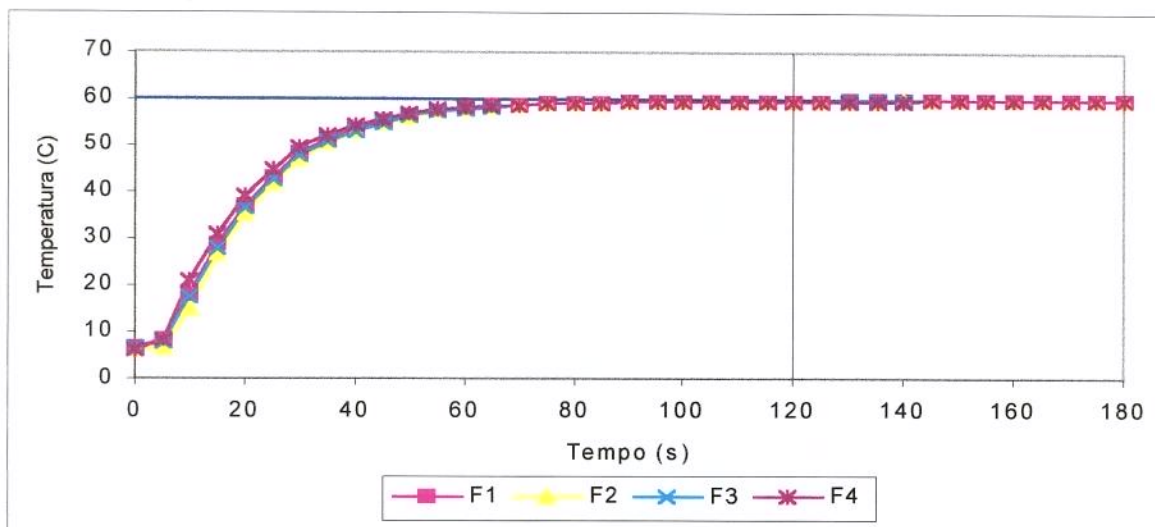


FIGURA 23. Perfil de penetração de calor nas formulações de hambúrguer durante aquecimento a 60,0°C

F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

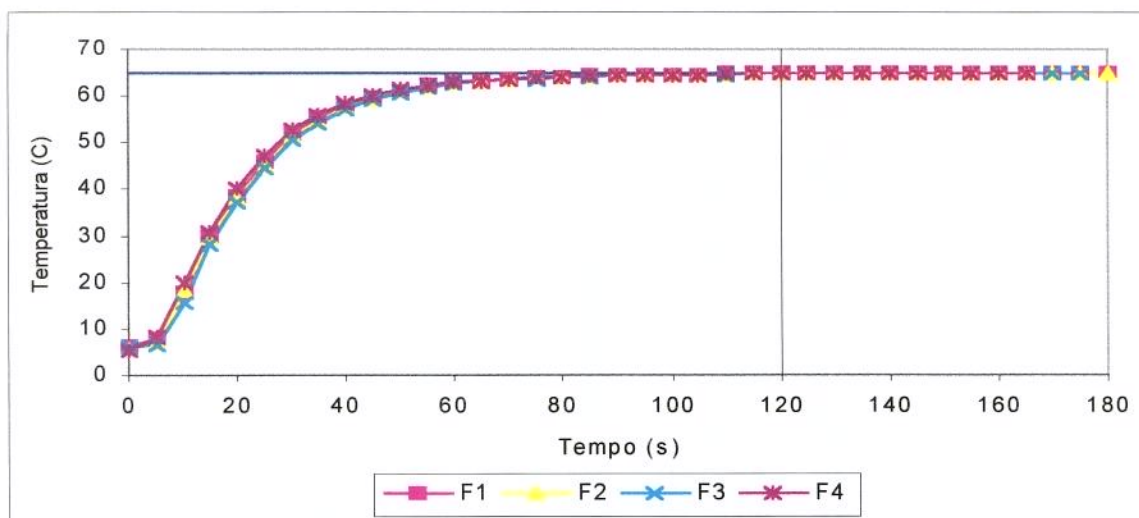


FIGURA 24. Perfil de penetração de calor nas formulações de hambúrguer durante aquecimento a 65,0°C.

F1: carne com 10% de gordura

F2: carne com 20% de gordura

F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

III. CÁLCULO DO TEMPO À TEMPERATURA DE REFERÊNCIA (TEMPERATURA DO BANHO) PARA CORREÇÃO DO EFEITO DEVIDO AO TEMPO “LAG” DE AQUECIMENTO

Fórmula do método geral (Stumbo, 1973):

$$L=10^{(T-T_R)/z}$$

onde L é a taxa letal, T é a temperatura da amostra durante o aquecimento (°C), T_R é a temperatura de referência (temperatura do banho) (°C) e os valores z iniciais (5,25°C e 5,72°C, para TPAP e LPM, respectivamente) foram obtidos através de regressão linear das curvas “fantasma” de destruição térmica ($\log_{10} D$ x temperatura), considerando-se a contagem obtida no tempo “lag” como contagem no tempo “zero” de aquecimento.

O tempo de aquecimento (F) à temperatura do banho foi calculado empregando-se o método de Patashnik (1953).

PATASHNIK, M. A simplified procedure for thermal process evaluation. **Food Technology**, Champaign, v.7, n.1, p.1-6, Jan., 1953.

STUMBO, C.R. **Thermobacteriology in Food Processing**. 2 ed. Academic Press, New York, 1973. 329p.

III.1 Cálculo para os Dados Obtidos em Ágar Triptose Fosfato Adicionado de 1% de Piruvato de Sódio (TPAP)

III.1.1 Cálculo inicial com $z = 5,25^{\circ}\text{C}$

(valor médio obtido através de regressão linear das curvas “fantasma” de destruição térmica, considerando-se a contagem obtida no tempo “lag” como contagem no tempo “zero” de aquecimento)

Temperatura de referência igual a $55,0^{\circ}\text{C}$

TABELA 1A. Cálculo do tempo à $55,0^{\circ}\text{C}$ para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Taxa Letal (L)	ΣL	$F_{55^{\circ}\text{C}}$ (min)
0	6,7	0,000		
5	8,0	0,000		
10	16,0	0,000		
15	25,6	0,000		
20	32,9	0,000		
25	38,7	0,001		
30	43,6	0,007		
35	46,5	0,024		
40	48,7	0,063		
45	50,5	0,139		
50	51,7	0,235		
55	52,6	0,349		
60	53,2	0,454		
65	53,5	0,518		
70	54,0	0,645		
75	54,1	0,674		
80	54,3	0,736		
85	54,4	0,769		
90	54,5	0,803		
95	54,6	0,839		
100	54,6	0,839		
105	54,7	0,877		
110	54,7	0,877		
115	54,8	0,916		
120	54,8	0,916	10,222	0,85

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 1B. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{55°C} (min)
0	6,4	0,000		
5	7,1	0,000		
10	14,8	0,000		
15	24,3	0,000		
20	32,2	0,000		
25	38,0	0,001		
30	42,6	0,004		
35	45,7	0,017		
40	48,0	0,046		
45	49,9	0,107		
50	51,3	0,197		
55	52,2	0,293		
60	52,9	0,398		
65	53,3	0,474		
70	53,7	0,565		
75	53,9	0,617		
80	54,1	0,674		
85	54,2	0,704		
90	54,3	0,736		
95	54,4	0,769		
100	54,5	0,803		
105	54,5	0,803		
110	54,6	0,839		
115	54,6	0,839		
120	54,7	0,877	9,326	0,77

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 1C. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F 55°C (min)
0	6,1	0,000		
5	8,1	0,000		
10	17,2	0,000		
15	27,2	0,000		
20	34,7	0,000		
25	39,8	0,001		
30	44,4	0,010		
35	47,0	0,030		
40	49,0	0,072		
45	50,6	0,145		
50	51,7	0,235		
55	52,6	0,349		
60	53,2	0,454		
65	53,4	0,496		
70	53,7	0,565		
75	54,0	0,645		
80	54,1	0,674		
85	54,2	0,704		
90	54,4	0,769		
95	54,5	0,803		
100	54,5	0,803		
105	54,6	0,839		
110	54,6	0,839		
115	54,7	0,877		
120	54,7	0,877	9,748	0,81

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 1D. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F 55°C (min)
0	5,5	0,000		
5	7,4	0,000		
10	16,9	0,000		
15	27,4	0,000		
20	34,2	0,000		
25	40,1	0,001		
30	44,2	0,009		
35	47,0	0,030		
40	49,1	0,075		
45	50,7	0,152		
50	51,8	0,246		
55	52,6	0,349		
60	53,1	0,435		
65	53,5	0,518		
70	53,8	0,591		
75	54,0	0,645		
80	54,1	0,674		
85	54,2	0,704		
90	54,3	0,736		
95	54,4	0,769		
100	54,5	0,803		
105	54,6	0,839		
110	54,6	0,839		
115	54,6	0,839		
120	54,7	0,877	9,691	0,80

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Temperatura de referência igual a 60,0°C

TABELA 2A. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,5	0,000		
5	8,0	0,000		
10	18,0	0,000		
15	28,6	0,000		
20	36,8	0,000		
25	43,0	0,001		
30	48,1	0,005		
35	51,3	0,022		
40	53,6	0,060		
45	55,4	0,133		
50	56,7	0,235		
55	57,5	0,334		
60	58,1	0,435		
65	58,5	0,518		
70	58,8	0,591		
75	59,1	0,674		
80	59,2	0,704		
85	59,3	0,736		
90	59,4	0,769		
95	59,5	0,803		
100	59,6	0,839		
105	59,6	0,839		
110	59,7	0,877		
115	59,7	0,877		
120	59,8	0,916	9,909	0,82

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 2B. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F 60°C (min)
0	6,1	0,000		
5	6,6	0,000		
10	14,9	0,000		
15	26,7	0,000		
20	35,2	0,000		
25	41,6	0,000		
30	46,9	0,003		
35	50,4	0,015		
40	53,0	0,046		
45	54,8	0,102		
50	56,2	0,189		
55	57,3	0,306		
60	58,0	0,416		
65	58,3	0,474		
70	58,6	0,541		
75	58,9	0,617		
80	59,1	0,674		
85	59,2	0,704		
90	59,4	0,769		
95	59,5	0,803		
100	59,6	0,839		
105	59,6	0,839		
110	59,6	0,839		
115	59,7	0,877		
120	59,7	0,877	9,493	0,79

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 2C. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,3	0,000		
5	7,8	0,000		
10	17,2	0,000		
15	27,7	0,000		
20	36,5	0,000		
25	42,6	0,000		
30	47,7	0,005		
35	50,9	0,018		
40	53,2	0,051		
45	55,0	0,112		
50	56,3	0,197		
55	57,3	0,306		
60	58,0	0,416		
65	58,4	0,496		
70	58,7	0,565		
75	59,0	0,645		
80	59,2	0,704		
85	59,3	0,736		
90	59,4	0,769		
95	59,5	0,803		
100	59,6	0,839		
105	59,6	0,839		
110	59,7	0,877		
115	59,7	0,877		
120	59,8	0,916	9,712	0,81

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 2D. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,2	0,000		
5	8,3	0,000		
10	20,8	0,000		
15	31,0	0,000		
20	39,0	0,000		
25	44,7	0,001		
30	49,4	0,010		
35	52,2	0,033		
40	54,2	0,079		
45	55,8	0,158		
50	56,9	0,257		
55	57,6	0,349		
60	58,2	0,454		
65	58,6	0,541		
70	58,8	0,591		
75	59,0	0,645		
80	59,1	0,674		
85	59,2	0,704		
90	59,4	0,769		
95	59,5	0,803		
100	59,5	0,803		
105	59,6	0,839		
110	59,6	0,839		
115	59,6	0,839		
120	59,7	0,877	9,826	0,82

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Temperatura de referência igual a 65,0°C

TABELA 3A. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	6,2	0,000		
5	7,8	0,000		
10	17,7	0,000		
15	29,8	0,000		
20	38,7	0,000		
25	45,9	0,000		
30	51,7	0,003		
35	55,2	0,014		
40	57,7	0,041		
45	59,7	0,098		
50	61,0	0,173		
55	62,1	0,280		
60	62,8	0,381	0,799	0,07
65	63,2	0,454		
70	63,7	0,565		
75	63,8	0,591		
80	64,0	0,645		
85	64,2	0,704		
90	64,4	0,769	4,333	0,36
95	64,5	0,803		
100	64,5	0,803		
105	64,6	0,839		
110	64,6	0,839		
115	64,7	0,877		
120	64,7	0,877	9,317	0,77

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 3B. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,5	0,000		
5	7,1	0,000		
10	18,3	0,000		
15	29,3	0,000		
20	38,1	0,000		
25	45,1	0,000		
30	51,2	0,002		
35	54,5	0,010		
40	57,3	0,034		
45	59,4	0,086		
50	60,8	0,158		
55	61,8	0,246		
60	62,6	0,349	0,711	0,06
65	63,2	0,454		
70	63,5	0,518		
75	63,8	0,591		
80	64,0	0,645		
85	64,1	0,674		
90	64,3	0,736	4,135	0,34
95	64,4	0,769		
100	64,4	0,769		
105	64,5	0,803		
110	64,6	0,839		
115	64,6	0,839		
120	64,7	0,877	8,960	0,74

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 3C. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	Σ L	F _{65°C} (min)
0	5,9	0,000		
5	6,5	0,000		
10	15,7	0,000		
15	27,9	0,000		
20	37,3	0,000		
25	44,6	0,000		
30	50,6	0,002		
35	54,2	0,009		
40	57,0	0,030		
45	59,0	0,072		
50	60,7	0,152		
55	61,7	0,235		
60	62,6	0,349	0,674	0,06
65	63,0	0,416		
70	63,5	0,518		
75	63,7	0,565		
80	63,9	0,617		
85	64,1	0,674		
90	64,3	0,736	4,007	0,33
95	64,4	0,769		
100	64,4	0,769		
105	64,5	0,803		
110	64,5	0,803		
115	64,6	0,839		
120	64,7	0,877	8,796	0,73

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 3D. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,4	0,000		
5	8,4	0,000		
10	19,8	0,000		
15	30,7	0,000		
20	40,2	0,000		
25	47,1	0,000		
30	52,6	0,004		
35	55,6	0,016		
40	58,2	0,051		
45	60,0	0,112		
50	61,3	0,197		
55	62,1	0,280		
60	62,9	0,398	0,860	0,07
65	63,3	0,474		
70	63,7	0,565		
75	63,9	0,617		
80	64,0	0,645		
85	64,2	0,704		
90	64,4	0,769	4,449	0,37
95	64,4	0,769		
100	64,5	0,803		
105	64,6	0,839		
110	64,6	0,839		
115	64,6	0,839		
120	64,7	0,877	9,361	0,78

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

III.1.2 Cálculo com $z = 4,88^{\circ}\text{C}$

(valor médio calculado a partir dos dados obtidos no item III.1.1)

Temperatura de referência igual a $55,0^{\circ}\text{C}$

TABELA 4A. Cálculo do tempo à $55,0^{\circ}\text{C}$ para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Taxa Letal (L)	ΣL	$F_{55^{\circ}\text{C}}$ (min)
0	6,7	0,000		
5	8,0	0,000		
10	16,0	0,000		
15	25,6	0,000		
20	32,9	0,000		
25	38,7	0,000		
30	43,6	0,005		
35	46,5	0,018		
40	48,7	0,051		
45	50,5	0,120		
50	51,7	0,211		
55	52,6	0,322		
60	53,2	0,428		
65	53,5	0,493		
70	54,0	0,624		
75	54,1	0,654		
80	54,3	0,719		
85	54,4	0,753		
90	54,5	0,790		
95	54,6	0,828		
100	54,6	0,828		
105	54,7	0,868		
110	54,7	0,868		
115	54,8	0,910		
120	54,8	0,910	9,944	0,83

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 4B. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{55°C} (min)
0	6,4	0,000		
5	7,1	0,000		
10	14,8	0,000		
15	24,3	0,000		
20	32,2	0,000		
25	38,0	0,000		
30	42,6	0,003		
35	45,7	0,012		
40	48,0	0,037		
45	49,9	0,090		
50	51,3	0,175		
55	52,2	0,267		
60	52,9	0,371		
65	53,3	0,448		
70	53,7	0,542		
75	53,9	0,595		
80	54,1	0,654		
85	54,2	0,686		
90	54,3	0,719		
95	54,4	0,753		
100	54,5	0,790		
105	54,5	0,790		
110	54,6	0,828		
115	54,6	0,828		
120	54,7	0,868	9,022	0,75

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 4C. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	Σ L	F 55°C (min)
0	6,1	0,000		
5	8,1	0,000		
10	17,2	0,000		
15	27,2	0,000		
20	34,7	0,000		
25	39,8	0,001		
30	44,4	0,007		
35	47,0	0,023		
40	49,0	0,059		
45	50,6	0,125		
50	51,7	0,211		
55	52,6	0,322		
60	53,2	0,428		
65	53,4	0,470		
70	53,7	0,542		
75	54,0	0,624		
80	54,1	0,654		
85	54,2	0,686		
90	54,4	0,753		
95	54,5	0,790		
100	54,5	0,790		
105	54,6	0,828		
110	54,6	0,828		
115	54,7	0,868		
120	54,7	0,868	9,442	0,78

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 4D. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{55°C} (min)
0	5,5	0,000		
5	7,4	0,000		
10	16,9	0,000		
15	27,4	0,000		
20	34,2	0,000		
25	40,1	0,001		
30	44,2	0,006		
35	47,0	0,023		
40	49,1	0,062		
45	50,7	0,131		
50	51,8	0,221		
55	52,6	0,322		
60	53,1	0,408		
65	53,5	0,493		
70	53,8	0,568		
75	54,0	0,624		
80	54,1	0,654		
85	54,2	0,686		
90	54,3	0,719		
95	54,4	0,753		
100	54,5	0,790		
105	54,6	0,828		
110	54,6	0,828		
115	54,6	0,828		
120	54,7	0,868	9,378	0,78

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja

Temperatura de referência igual a 60,0°C

TABELA 5A. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	Σ L	F _{60°C} (min)
0	6,5	0,000		
5	8,0	0,000		
10	18,0	0,000		
15	28,6	0,000		
20	36,8	0,000		
25	43,0	0,000		
30	48,1	0,004		
35	51,3	0,016		
40	53,6	0,049		
45	55,4	0,114		
50	56,7	0,211		
55	57,5	0,307		
60	58,1	0,408		
65	58,5	0,493		
70	58,8	0,568		
75	59,1	0,654		
80	59,2	0,686		
85	59,3	0,719		
90	59,4	0,753		
95	59,5	0,790		
100	59,6	0,828		
105	59,6	0,828		
110	59,7	0,868		
115	59,7	0,868		
120	59,8	0,910	9,619	0,80

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 5B. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,1	0,000		
5	6,6	0,000		
10	14,9	0,000		
15	26,7	0,000		
20	35,2	0,000		
25	41,6	0,000		
30	46,9	0,002		
35	50,4	0,011		
40	53,0	0,037		
45	54,8	0,086		
50	56,2	0,166		
55	57,3	0,280		
60	58,0	0,389		
65	58,3	0,448		
70	58,6	0,517		
75	58,9	0,595		
80	59,1	0,654		
85	59,2	0,686		
90	59,4	0,753		
95	59,5	0,790		
100	59,6	0,828		
105	59,6	0,828		
110	59,6	0,828		
115	59,7	0,868		
120	59,7	0,868	9,200	0,76

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 5C. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,3	0,000		
5	7,8	0,000		
10	17,2	0,000		
15	27,7	0,000		
20	36,5	0,000		
25	42,6	0,000		
30	47,7	0,003		
35	50,9	0,014		
40	53,2	0,040		
45	55,0	0,094		
50	56,3	0,175		
55	57,3	0,280		
60	58,0	0,389		
65	58,4	0,470		
70	58,7	0,542		
75	59,0	0,624		
80	59,2	0,686		
85	59,3	0,719		
90	59,4	0,753		
95	59,5	0,790		
100	59,6	0,828		
105	59,6	0,828		
110	59,7	0,868		
115	59,7	0,868		
120	59,8	0,910	9,425	0,78

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 5D. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,2	0,000		
5	8,3	0,000		
10	20,8	0,000		
15	31,0	0,000		
20	39,0	0,000		
25	44,7	0,001		
30	49,4	0,007		
35	52,2	0,025		
40	54,2	0,065		
45	55,8	0,138		
50	56,9	0,232		
55	57,6	0,322		
60	58,2	0,428		
65	58,6	0,517		
70	58,8	0,568		
75	59,0	0,624		
80	59,1	0,654		
85	59,2	0,686		
90	59,4	0,753		
95	59,5	0,790		
100	59,5	0,790		
105	59,6	0,828		
110	59,6	0,828		
115	59,6	0,828		
120	59,7	0,868	9,516	0,79

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Temperatura de referência igual a 65,0°C

TABELA 6A. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	6,2	0,000		
5	7,8	0,000		
10	17,7	0,000		
15	29,8	0,000		
20	38,7	0,000		
25	45,9	0,000		
30	51,7	0,002		
35	55,2	0,010		
40	57,7	0,032		
45	59,7	0,082		
50	61,0	0,151		
55	62,1	0,255		
60	62,8	0,354	0,709	0,06
65	63,2	0,428		
70	63,7	0,542		
75	63,8	0,568		
80	64,0	0,624		
85	64,2	0,686		
90	64,4	0,753	4,109	0,34
95	64,5	0,790		
100	64,5	0,790		
105	64,6	0,828		
110	64,6	0,828		
115	64,7	0,868		
120	64,7	0,868	9,023	0,75

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 6B. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,5	0,000		
5	7,1	0,000		
10	18,3	0,000		
15	29,3	0,000		
20	38,1	0,000		
25	45,1	0,000		
30	51,2	0,001		
35	54,5	0,007		
40	57,3	0,026		
45	59,4	0,071		
50	60,8	0,138		
55	61,8	0,221		
60	62,6	0,322	0,626	0,05
65	63,2	0,428		
70	63,5	0,493		
75	63,8	0,568		
80	64,0	0,624		
85	64,1	0,654		
90	64,3	0,719	3,913	0,32
95	64,4	0,753		
100	64,4	0,753		
105	64,5	0,790		
110	64,6	0,828		
115	64,6	0,828		
120	64,7	0,868	8,659	0,72

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 6C. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	Σ L	F _{65°C} (min)
0	5,9	0,000		
5	6,5	0,000		
10	15,7	0,000		
15	27,9	0,000		
20	37,3	0,000		
25	44,6	0,000		
30	50,6	0,001		
35	54,2	0,006		
40	57,0	0,023		
45	59,0	0,059		
50	60,7	0,131		
55	61,7	0,211		
60	62,6	0,322	0,593	0,05
65	63,0	0,389		
70	63,5	0,493		
75	63,7	0,542		
80	63,9	0,595		
85	64,1	0,654		
90	64,3	0,719	3,786	0,31
95	64,4	0,753		
100	64,4	0,753		
105	64,5	0,790		
110	64,5	0,790		
115	64,6	0,828		
120	64,7	0,868	8,494	0,70

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 6D. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,4	0,000		
5	8,4	0,000		
10	19,8	0,000		
15	30,7	0,000		
20	40,2	0,000		
25	47,1	0,000		
30	52,6	0,003		
35	55,6	0,012		
40	58,2	0,040		
45	60,0	0,094		
50	61,3	0,175		
55	62,1	0,255		
60	62,9	0,371	0,765	0,06
65	63,3	0,448		
70	63,7	0,542		
75	63,9	0,595		
80	64,0	0,624		
85	64,2	0,686		
90	64,4	0,753	4,221	0,35
95	64,4	0,753		
100	64,5	0,790		
105	64,6	0,828		
110	64,6	0,828		
115	64,6	0,828		
120	64,7	0,868	9,059	0,75

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

III.2 Cálculo para os Dados Obtidos em Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (LPM)

III.2.1 Cálculo inicial com $z = 5,72^{\circ}\text{C}$

(valor médio obtido através de regressão linear das curvas “fantasma” de destruição térmica, considerando-se a contagem obtida no tempo “lag” como contagem no tempo “zero” de aquecimento)

Temperatura de referência igual a $55,0^{\circ}\text{C}$

TABELA 7A. Cálculo do tempo à $55,0^{\circ}\text{C}$ para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Taxa Letal (L)	ΣL	$F_{55^{\circ}\text{C}}$ (min)
0	6,7	0,000		
5	8,0	0,000		
10	16,0	0,000		
15	25,6	0,000		
20	32,9	0,000		
25	38,7	0,001		
30	43,6	0,010		
35	46,5	0,033		
40	48,7	0,079		
45	50,5	0,163		
50	51,7	0,265		
55	52,6	0,381		
60	53,2	0,485		
65	53,5	0,547		
70	54,0	0,669		
75	54,1	0,696		
80	54,3	0,754		
85	54,4	0,785		
90	54,5	0,818		
95	54,6	0,851		
100	54,6	0,851		
105	54,7	0,886		
110	54,7	0,886		
115	54,8	0,923		
120	54,8	0,923	10,545	0,88

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 7B. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{55°C} (min)
0	6,4	0,000		
5	7,1	0,000		
10	14,8	0,000		
15	24,3	0,000		
20	32,2	0,000		
25	38,0	0,001		
30	42,6	0,007		
35	45,7	0,024		
40	48,0	0,060		
45	49,9	0,128		
50	51,3	0,226		
55	52,2	0,324		
60	52,9	0,429		
65	53,3	0,504		
70	53,7	0,593		
75	53,9	0,642		
80	54,1	0,696		
85	54,2	0,725		
90	54,3	0,754		
95	54,4	0,785		
100	54,5	0,818		
105	54,5	0,818		
110	54,6	0,851		
115	54,6	0,851		
120	54,7	0,886	9,679	0,80

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 7C. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{55°C} (min)
0	6,1	0,000		
5	8,1	0,000		
10	17,2	0,000		
15	27,2	0,000		
20	34,7	0,000		
25	39,8	0,002		
30	44,4	0,014		
35	47,0	0,040		
40	49,0	0,089		
45	50,6	0,170		
50	51,7	0,265		
55	52,6	0,381		
60	53,2	0,485		
65	53,4	0,525		
70	53,7	0,593		
75	54,0	0,669		
80	54,1	0,696		
85	54,2	0,725		
90	54,4	0,785		
95	54,5	0,818		
100	54,5	0,818		
105	54,6	0,851		
110	54,6	0,851		
115	54,7	0,886		
120	54,7	0,886	10,106	0,84

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 7D. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{55°C} (min)
0	5,5	0,000		
5	7,4	0,000		
10	16,9	0,000		
15	27,4	0,000		
20	34,2	0,000		
25	40,1	0,002		
30	44,2	0,013		
35	47,0	0,040		
40	49,1	0,093		
45	50,7	0,177		
50	51,8	0,276		
55	52,6	0,381		
60	53,1	0,465		
65	53,5	0,547		
70	53,8	0,617		
75	54,0	0,669		
80	54,1	0,696		
85	54,2	0,725		
90	54,3	0,754		
95	54,4	0,785		
100	54,5	0,818		
105	54,6	0,851		
110	54,6	0,851		
115	54,6	0,851		
120	54,7	0,886	10,055	0,83

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Temperatura de referência igual a 60,0°C

TABELA 8A. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,5	0,000		
5	8,0	0,000		
10	18,0	0,000		
15	28,6	0,000		
20	36,8	0,000		
25	43,0	0,001		
30	48,1	0,008		
35	51,3	0,030		
40	53,6	0,076		
45	55,4	0,157		
50	56,7	0,265		
55	57,5	0,366		
60	58,1	0,465		
65	58,5	0,547		
70	58,8	0,617		
75	59,1	0,696		
80	59,2	0,725		
85	59,3	0,754		
90	59,4	0,785		
95	59,5	0,818		
100	59,6	0,851		
105	59,6	0,851		
110	59,7	0,886		
115	59,7	0,886		
120	59,8	0,923	10,247	0,85

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 8B. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,1	0,000		
5	6,6	0,000		
10	14,9	0,000		
15	26,7	0,000		
20	35,2	0,000		
25	41,6	0,001		
30	46,9	0,005		
35	50,4	0,021		
40	53,0	0,060		
45	54,8	0,123		
50	56,2	0,217		
55	57,3	0,337		
60	58,0	0,447		
65	58,3	0,504		
70	58,6	0,569		
75	58,9	0,642		
80	59,1	0,696		
85	59,2	0,725		
90	59,4	0,785		
95	59,5	0,818		
100	59,6	0,851		
105	59,6	0,851		
110	59,6	0,851		
115	59,7	0,886		
120	59,7	0,886	9,834	0,82

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 8C. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,3	0,000		
5	7,8	0,000		
10	17,2	0,000		
15	27,7	0,000		
20	36,5	0,000		
25	42,6	0,001		
30	47,7	0,007		
35	50,9	0,026		
40	53,2	0,065		
45	55,0	0,134		
50	56,3	0,226		
55	57,3	0,337		
60	58,0	0,447		
65	58,4	0,525		
70	58,7	0,593		
75	59,0	0,669		
80	59,2	0,725		
85	59,3	0,754		
90	59,4	0,785		
95	59,5	0,818		
100	59,6	0,851		
105	59,6	0,851		
110	59,7	0,886		
115	59,7	0,886		
120	59,8	0,923	10,047	0,83

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 8D. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,2	0,000		
5	8,3	0,000		
10	20,8	0,000		
15	31,0	0,000		
20	39,0	0,000		
25	44,7	0,002		
30	49,4	0,014		
35	52,2	0,043		
40	54,2	0,097		
45	55,8	0,184		
50	56,9	0,287		
55	57,6	0,381		
60	58,2	0,485		
65	58,6	0,569		
70	58,8	0,617		
75	59,0	0,669		
80	59,1	0,696		
85	59,2	0,725		
90	59,4	0,785		
95	59,5	0,818		
100	59,5	0,818		
105	59,6	0,851		
110	59,6	0,851		
115	59,6	0,851		
120	59,7	0,886	10,186	0,85

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Temperatura de referência igual a 65,0°C

TABELA 9A. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	Σ L	F _{65°C} (min)
0	6,2	0,000		
5	7,8	0,000		
10	17,7	0,000		
15	29,8	0,000		
20	38,7	0,000		
25	45,9	0,000		
30	51,7	0,005		
35	55,2	0,019		
40	57,7	0,053		
45	59,7	0,118		
50	61,0	0,200		
55	62,1	0,311		
60	62,8	0,412	0,913	0,08
65	63,2	0,485		
70	63,7	0,593		
75	63,8	0,617		
80	64,0	0,669		
85	64,2	0,725		
90	64,4	0,785	4,599	0,38
95	64,5	0,818		
100	64,5	0,818		
105	64,6	0,851		
110	64,6	0,851		
115	64,7	0,886		
120	64,7	0,886	9,659	0,80

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 9B. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,5	0,000		
5	7,1	0,000		
10	18,3	0,000		
15	29,3	0,000		
20	38,1	0,000		
25	45,1	0,000		
30	51,2	0,004		
35	54,5	0,015		
40	57,3	0,045		
45	59,4	0,105		
50	60,8	0,184		
55	61,8	0,276		
60	62,6	0,381	0,819	0,07
65	63,2	0,485		
70	63,5	0,547		
75	63,8	0,617		
80	64,0	0,669		
85	64,1	0,696		
90	64,3	0,754	4,400	0,37
95	64,4	0,785		
100	64,4	0,785		
105	64,5	0,818		
110	64,6	0,851		
115	64,6	0,851		
120	64,7	0,886	9,311	0,77

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 9C. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo
“lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	Σ L	F _{65°C} (min)
0	5,9	0,000		
5	6,5	0,000		
10	15,7	0,000		
15	27,9	0,000		
20	37,3	0,000		
25	44,6	0,000		
30	50,6	0,003		
35	54,2	0,013		
40	57,0	0,040		
45	59,0	0,089		
50	60,7	0,177		
55	61,7	0,265		
60	62,6	0,381	0,778	0,06
65	63,0	0,447		
70	63,5	0,547		
75	63,7	0,593		
80	63,9	0,642		
85	64,1	0,696		
90	64,3	0,754	4,270	0,35
95	64,4	0,785		
100	64,4	0,785		
105	64,5	0,818		
110	64,5	0,818		
115	64,6	0,851		
120	64,7	0,886	9,148	0,76

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 9D. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,4	0,000		
5	8,4	0,000		
10	19,8	0,000		
15	30,7	0,000		
20	40,2	0,000		
25	47,1	0,001		
30	52,6	0,007		
35	55,6	0,023		
40	58,2	0,065		
45	60,0	0,134		
50	61,3	0,226		
55	62,1	0,311		
60	62,9	0,429	0,980	0,08
65	63,3	0,504		
70	63,7	0,593		
75	63,9	0,642		
80	64,0	0,669		
85	64,2	0,725		
90	64,4	0,785	4,720	0,39
95	64,4	0,785		
100	64,5	0,818		
105	64,6	0,851		
110	64,6	0,851		
115	64,6	0,851		
120	64,7	0,886	9,713	0,81

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

III.2.2 Cálculo com $z = 5,11^{\circ}\text{C}$

(valor médio calculado a partir dos dados obtidos no item III.2.1)

Temperatura de referência igual a $55,0^{\circ}\text{C}$

TABELA 10A. Cálculo do tempo à $55,0^{\circ}\text{C}$ para correção do efeito devido ao tempo "lag" de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Taxa Letal (L)	ΣL	$F_{55^{\circ}\text{C}}$ (min)
0	6,7	0,000		
5	8,0	0,000		
10	16,0	0,000		
15	25,6	0,000		
20	32,9	0,000		
25	38,7	0,001		
30	43,6	0,006		
35	46,5	0,022		
40	48,7	0,058		
45	50,5	0,132		
50	51,7	0,226		
55	52,6	0,339		
60	53,2	0,444		
65	53,5	0,509		
70	54,0	0,637		
75	54,1	0,667		
80	54,3	0,729		
85	54,4	0,763		
90	54,5	0,798		
95	54,6	0,835		
100	54,6	0,835		
105	54,7	0,874		
110	54,7	0,874		
115	54,8	0,914		
120	54,8	0,914	10,119	0,84

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 10B. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F 55°C (min)
0	6,4	0,000		
5	7,1	0,000		
10	14,8	0,000		
15	24,3	0,000		
20	32,2	0,000		
25	38,0	0,000		
30	42,6	0,004		
35	45,7	0,015		
40	48,0	0,043		
45	49,9	0,100		
50	51,3	0,189		
55	52,2	0,283		
60	52,9	0,388		
65	53,3	0,465		
70	53,7	0,557		
75	53,9	0,609		
80	54,1	0,667		
85	54,2	0,697		
90	54,3	0,729		
95	54,4	0,763		
100	54,5	0,798		
105	54,5	0,798		
110	54,6	0,835		
115	54,6	0,835		
120	54,7	0,874	9,213	0,76

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 10C. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F 55°C (min)
0	6,1	0,000		
5	8,1	0,000		
10	17,2	0,000		
15	27,2	0,000		
20	34,7	0,000		
25	39,8	0,001		
30	44,4	0,008		
35	47,0	0,027		
40	49,0	0,067		
45	50,6	0,138		
50	51,7	0,226		
55	52,6	0,339		
60	53,2	0,444		
65	53,4	0,486		
70	53,7	0,557		
75	54,0	0,637		
80	54,1	0,667		
85	54,2	0,697		
90	54,4	0,763		
95	54,5	0,798		
100	54,5	0,798		
105	54,6	0,835		
110	54,6	0,835		
115	54,7	0,874		
120	54,7	0,874	9,635	0,80

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 10D. Cálculo do tempo à 55,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{55°C} (min)
0	5,5	0,000		
5	7,4	0,000		
10	16,9	0,000		
15	27,4	0,000		
20	34,2	0,000		
25	40,1	0,001		
30	44,2	0,008		
35	47,0	0,027		
40	49,1	0,070		
45	50,7	0,144		
50	51,8	0,236		
55	52,6	0,339		
60	53,1	0,425		
65	53,5	0,509		
70	53,8	0,582		
75	54,0	0,637		
80	54,1	0,667		
85	54,2	0,697		
90	54,3	0,729		
95	54,4	0,763		
100	54,5	0,798		
105	54,6	0,835		
110	54,6	0,835		
115	54,6	0,835		
120	54,7	0,874	9,576	0,79

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Temperatura de referência igual a 60,0°C

TABELA 11A. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,5	0,000		
5	8,0	0,000		
10	18,0	0,000		
15	28,6	0,000		
20	36,8	0,000		
25	43,0	0,000		
30	48,1	0,005		
35	51,3	0,020		
40	53,6	0,056		
45	55,4	0,126		
50	56,7	0,226		
55	57,5	0,324		
60	58,1	0,425		
65	58,5	0,509		
70	58,8	0,582		
75	59,1	0,667		
80	59,2	0,697		
85	59,3	0,729		
90	59,4	0,763		
95	59,5	0,798		
100	59,6	0,835		
105	59,6	0,835		
110	59,7	0,874		
115	59,7	0,874		
120	59,8	0,914	9,802	0,81

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 11B. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,1	0,000		
5	6,6	0,000		
10	14,9	0,000		
15	26,7	0,000		
20	35,2	0,000		
25	41,6	0,000		
30	46,9	0,003		
35	50,4	0,013		
40	53,0	0,043		
45	54,8	0,096		
50	56,2	0,180		
55	57,3	0,296		
60	58,0	0,406		
65	58,3	0,465		
70	58,6	0,532		
75	58,9	0,609		
80	59,1	0,667		
85	59,2	0,697		
90	59,4	0,763		
95	59,5	0,798		
100	59,6	0,835		
105	59,6	0,835		
110	59,6	0,835		
115	59,7	0,874		
120	59,7	0,874	9,385	0,78

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 11C. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	Σ L	F _{60°C} (min)
0	6,3	0,000		
5	7,8	0,000		
10	17,2	0,000		
15	27,7	0,000		
20	36,5	0,000		
25	42,6	0,000		
30	47,7	0,004		
35	50,9	0,017		
40	53,2	0,047		
45	55,0	0,105		
50	56,3	0,189		
55	57,3	0,296		
60	58,0	0,406		
65	58,4	0,486		
70	58,7	0,557		
75	59,0	0,637		
80	59,2	0,697		
85	59,3	0,729		
90	59,4	0,763		
95	59,5	0,798		
100	59,6	0,835		
105	59,6	0,835		
110	59,7	0,874		
115	59,7	0,874		
120	59,8	0,914	9,606	0,80

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 11D. Cálculo do tempo à 60,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{60°C} (min)
0	6,2	0,000		
5	8,3	0,000		
10	20,8	0,000		
15	31,0	0,000		
20	39,0	0,000		
25	44,7	0,001		
30	49,4	0,008		
35	52,2	0,030		
40	54,2	0,073		
45	55,8	0,151		
50	56,9	0,247		
55	57,6	0,339		
60	58,2	0,444		
65	58,6	0,532		
70	58,8	0,582		
75	59,0	0,637		
80	59,1	0,667		
85	59,2	0,697		
90	59,4	0,763		
95	59,5	0,798		
100	59,5	0,798		
105	59,6	0,835		
110	59,6	0,835		
115	59,6	0,835		
120	59,7	0,874	9,711	0,81

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada

Temperatura de referência igual a 65,0°C

TABELA 12A. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F1^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	6,2	0,000		
5	7,8	0,000		
10	17,7	0,000		
15	29,8	0,000		
20	38,7	0,000		
25	45,9	0,000		
30	51,7	0,002		
35	55,2	0,012		
40	57,7	0,037		
45	59,7	0,092		
50	61,0	0,165		
55	62,1	0,271		
60	62,8	0,371	0,765	0,06
65	63,2	0,444		
70	63,7	0,557		
75	63,8	0,582		
80	64,0	0,637		
85	64,2	0,697		
90	64,4	0,763	4,250	0,35
95	64,5	0,798		
100	64,5	0,798		
105	64,6	0,835		
110	64,6	0,835		
115	64,7	0,874		
120	64,7	0,874	9,209	0,76

a: F1: carne com 10% de gordura

TABELA 12B. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F2^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,5	0,000		
5	7,1	0,000		
10	18,3	0,000		
15	29,3	0,000		
20	38,1	0,000		
25	45,1	0,000		
30	51,2	0,002		
35	54,5	0,009		
40	57,3	0,031		
45	59,4	0,080		
50	60,8	0,151		
55	61,8	0,236		
60	62,6	0,339	0,679	0,06
65	63,2	0,444		
70	63,5	0,509		
75	63,8	0,582		
80	64,0	0,637		
85	64,1	0,667		
90	64,3	0,729	4,053	0,34
95	64,4	0,763		
100	64,4	0,763		
105	64,5	0,798		
110	64,6	0,835		
115	64,6	0,835		
120	64,7	0,874	8,849	0,73

a: F2: carne com 20% de gordura

TABELA 12C. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F3^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,9	0,000		
5	6,5	0,000		
10	15,7	0,000		
15	27,9	0,000		
20	37,3	0,000		
25	44,6	0,000		
30	50,6	0,002		
35	54,2	0,008		
40	57,0	0,027		
45	59,0	0,067		
50	60,7	0,144		
55	61,7	0,226		
60	62,6	0,339	0,643	0,05
65	63,0	0,406		
70	63,5	0,509		
75	63,7	0,557		
80	63,9	0,609		
85	64,1	0,667		
90	64,3	0,729	3,925	0,33
95	64,4	0,763		
100	64,4	0,763		
105	64,5	0,798		
110	64,5	0,798		
115	64,6	0,835		
120	64,7	0,874	8,684	0,72

a: F3: carne com 10% de gordura e 1,5% de cloreto de sódio

TABELA 12D. Cálculo do tempo à 65,0°C para correção do efeito devido ao tempo “lag” de aquecimento para a formulação F4^a

Tempo (s)	Temperatura (°C)	Taxa Letal (L)	ΣL	F _{65°C} (min)
0	5,4	0,000		
5	8,4	0,000		
10	19,8	0,000		
15	30,7	0,000		
20	40,2	0,000		
25	47,1	0,000		
30	52,6	0,004		
35	55,6	0,014		
40	58,2	0,047		
45	60,0	0,105		
50	61,3	0,189		
55	62,1	0,271		
60	62,9	0,388	0,824	0,07
65	63,3	0,465		
70	63,7	0,557		
75	63,9	0,609		
80	64,0	0,637		
85	64,2	0,697		
90	64,4	0,763	4,365	0,36
95	64,4	0,763		
100	64,5	0,798		
105	64,6	0,835		
110	64,6	0,835		
115	64,6	0,835		
120	64,7	0,874	9,250	0,77

a: F4: carne com 10% de gordura e 10,5% de proteína texturizada de soja hidratada