

**JÉSSICA SOARES MIRANDA  
NATHAN CAMPOS SOARES**

## **UTILIZAÇÃO DE CULTURA BIOPROTETORA EM HAMBÚRGUERES**

Trabalho de Conclusão apresentado ao *Campus* Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como parte das exigências do curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

**RIO POMBA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016**

**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Jofre Moreira – IFET/RP**  
**Bibliotecária: Tatiana dos Reis Maciel CRB 6 / 2711**

M672u Miranda, Jéssica Soares.  
Utilização de cultura bioprotetora em hambúrgueres. / Jéssica Soares Miranda; Nathan Campos Soares. – Rio Pomba, 2016.  
40f. : il.

Orientador: Prof. <sup>a</sup> Dsc. Wellingta Cristina A. N. Benevenuto.

Trabalho de Conclusão de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba.

1. Alimentos. 2. Carne - hambúrguer. 3. Cultura *starters*. I. BENEVENUTO, Wellingta Cristina Almeida do Nascimento (orient.). II. Título.

CDD: 664

**JÉSSICA SOARES MIRANDA  
NATHAN CAMPOS SOARES**

**UTILIZAÇÃO DE CULTURA BIOPROTETORA EM HAMBÚRGUERES**

Trabalho de Conclusão apresentado ao *Campus* Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como parte das exigências do curso Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Bacharel em Alimentos.

Orientadora: Profa. Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto

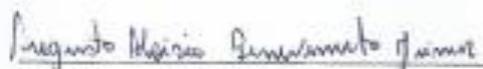
**RIO POMBA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016**

JÉSSICA SOARES MIRANDA  
NATHAN CAMPOS SOARES

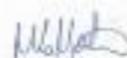
UTILIZAÇÃO DE CULTURA BIOPROTETORA EM HAMBÚRGUERES

Trabalho de Conclusão apresentado ao Campus Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como parte das exigências do curso Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Bacharel em Alimentos.

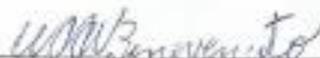
APROVADA: 07 de dezembro de 2016.



Prof. Augusto Aloisio Benevenuto Junior  
Co-orientador



Prof. Maurilio Lopes Martins  
Co-orientador



Profª Wellington Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

Mais uma etapa vencida. Durante este caminho, sei o quão foram importantes às pessoas na nossa caminhada, tenho que agradecer a muitos, afinal, não conquistei nada sozinha. Primeiramente a Deus, que se faz sempre presente em todos os passos da minha vida. Aos meus pais, Gisele e Marco Aurélio, que sempre me apoiaram em qualquer que fosse minha decisão, vocês foram uma peça chave, serei sempre grata e ao meu irmão Jean que mesmo de longe esteve sempre presente com seus conselhos e palavras de conforto, como também aos demais familiares que torceram para esta conquista. A minha orientadora Dra. Wellingta, pelo suporte, pelas suas correções e incentivos. Agradeço também aos co-orientadores professor Dr. Maurílio e ao professor Dr. Augusto por contribuírem com as análises no laboratório de microbiologia e orientação no setor de carnes. Aos colegas de turma e a todos os meus amigos, obrigada por ouvir, rir e chorar comigo, pela convivência e alegrias compartilhadas. Fica aqui todo o meu agradecimento e felicidade de estar formando.

Jéssica Soares Miranda

Agradeço primeiramente a Deus, por ter possibilitado a realização de mais um sonho e estar presente nos momentos de maior dificuldade. Agradeço aos meus pais Nilson e Maria Isabel por não medirem esforços para realização desse sonho, pelo amor incondicional, por serem meu exemplo e por me incentivarem sempre. Ao meu irmão Igor, agradeço por estar sempre ao meu lado e toda minha família pelo apoio e torcida. Agradeço também a professora Dra. Wellingta pela orientação, conselhos e troca de conhecimentos, agradeço aos co-orientadores professor Dr. Maurílio por toda colaboração no laboratório de microbiologia e o professor Dr. Augusto pela orientação no setor de carnes. Ao IF Sudeste – campus Rio Pomba por ser minha segunda casa e por fim aos amigos que compartilharam deste momento comigo e todos aqueles que torceram por mim.

Nathan Campos Soares

# Ciência e Tecnologia de Alimentos

## UTILIZAÇÃO DE CULTURA BIOPROTETORA EM HAMBÚRGUERES

### RESUMO

**Jéssica Soares Miranda**  
**Nathan Campos Soares**

**Dezembro, 2016**

**Orientadora:** Wellingta Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto.

A permanência de hambúrgueres em frízeres de supermercados em temperaturas adequadas tem se mostrado um grande desafio, trazendo a necessidade de emprego de novas tecnologias. Este trabalho objetivou avaliar a possibilidade de utilização de cultura *starters* como bioprotetores em condições de abuso de temperatura, considerando que a segurança microbiológica de hambúrgueres é garantida principalmente pelo congelamento. Os hambúrgueres foram elaborados utilizando-se uma mesma mistura de ingredientes cárneos, que foram divididas para três tratamentos: 1 – congelado; 2 – congelado e descongelado e 3 – congelado e descongelado com adição de cultura bioprotetora. As determinações microbiológicas e tecnológicas foram realizadas no tempo 0 e a cada 15 dias de armazenamento até o tempo 45. Verificou-se para a análise de bactérias lácticas que houve diferença significativa ( $P < 0,01$ ) entre todos os tratamentos, sendo o tratamento 3 o que apresentou maior média, demonstrando que a cultura iniciadora se desenvolveu no produto, o que é importante para que ela tenha efeito bioprotetor. Para a avaliação de coliformes totais e termotolerantes observou-se que o tratamento 2 diferiu significativamente ( $P < 0,01$ ) dos demais tratamentos, demonstrando o risco do descongelamento dos produtos durante o armazenamento. A avaliação de mesófilos aeróbios mostrou que o tratamento 3 apresentou maior média de microrganismos aeróbios mesófilos, diferindo significativamente dos demais tratamentos ( $P < 0,01$ ), o maior desenvolvimento de aeróbios mesófilos nesse tratamento está relacionado ao desenvolvimento da cultura starter adicionada no ágar padrão para contagem. A análise de psicotrópicos aeróbios Gram negativos mostrou não haver diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre os tratamentos 1 e 3. Estes resultados demonstram o

efeito antagonístico promovido pela cultura iniciadora frente aos contaminantes psicrotróficos no hambúrguer. Não foram encontrados *Salmonella* spp. e estafilococos coagulase positiva em nenhum dos tratamentos e em nenhuma das amostras. Com relação as avaliações tecnológicas os resultados de cor apresentaram valores de L\* significativos ( $p < 0,01$ ) entre os tratamentos, a cor mais escura foi verificada no tratamento 1, seguido do 3 e 2, demonstrando que o congelamento foi eficaz para evitar o escurecimento dos hambúrgueres. A análise de pH apresentou no tempo 45 maiores valores de pH para os tratamentos 2 e 3, isso se deve ao abuso de temperatura e a presença de micro-organismos, que para se desenvolver utilizaram como substrato a proteína e conseqüentemente o pH se elevou. Não foi verificada diferenças significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de encolhimento e nem para o rendimento de cocções entre os tratamentos 1 – congelado; 2 – congelado e descongelado e 3 – congelado e descongelado com adição de cultura bioprotetora., demonstrando o efeito do descongelamento nos hambúrgueres. Embora o congelamento ainda seja o melhor método de conservação a utilização de culturas bioprotetoras em hambúrgueres se mostrou eficiente para a manutenção da qualidade do produto.

**Palavras-chave:** avaliações microbiológicas, avaliações tecnológicas, cultura *starter*.

**FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**  
**USE OF BIOPROTECTIVE CULTURE IN HAMBURGER**

**ABSTRACT**

**Jéssica Soares Miranda**  
**Nathan Campos Soares**

**December, 2016**

**Adviser:** Wellington Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto

The permanence of hamburgers in supermarkets fridges at adequate temperatures has been a great challenge, bringing the need for new technologies. Considering that microbiological safety of hamburgers is mainly guaranteed by freezing, this work evaluated the possibility of using starter culture as bioprotector under temperature abuse conditions. The burgers were made using the same meat ingredients mixture, which were divided into three treatments: (1) frozen; (2) frozen and thawed; and (3) frozen and thawed with addition of culture starter. Microbiological and technological determinations were performed at 0, 15, 30 e 45 days. Lactic bacteria analysis showed that there was a significant difference ( $p < 0.01$ ) among all treatments, treatment 3, which presented the highest average, demonstrated that the starter culture was developed in the product, which was important to the bioprotective effect. For the total and thermotolerant coliforms evaluation were observed that treatment 2 differed significantly ( $P < 0.01$ ) from the others, demonstrating the thawing risk of the products during storage. The evaluation of aerobic mesophylls showed that treatment 3 presented a higher average of aerobic mesophilic microorganisms, differing significantly from the other treatments ( $p < 0.01$ ), the higher development of mesophilic aerobes in this treatment is related to the development of the added starter culture. Gram-negative aerobic psychotropic analysis showed no significant difference ( $p < 0.01$ ) between treatments 1 and 3. These results demonstrate the antagonistic effect promoted by the starter culture against the psychrotrophic contaminants in the hamburger. Regarding the technological evaluations, the color results presented significant different values of  $L^*$  ( $p > 0.01$ ) between the groups, the darker shade was verified in the treatment 1, followed by the 3 and 2, proving that the

freezing was effective to avoid the burgers dimming. The pH analysis presented higher values, in the time 45 days, for the treatments 2 and 3, this is due to the temperature abuse and the presence of microorganisms, that to develop used as substrate the protein and consequently the pH increased. There was no significant differences ( $p < 0.05$ ) in the shrinkage percentage or the cooking yield between treatments, demonstrating the effect of thawing on hamburgers. Although freezing still was the best preservation method to the meat, the use of bioprotective cultures in hamburgers has proved to be efficient in maintaining the quality of the product.

**Keywords:** microbiological evaluations, technological evaluations, starter culture.



## SUMÁRIO

Página

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT .....	iv
1.INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
2.1. Objetivo Geral .....	2
2.2. Objetivos Específicos .....	2
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO .....	3
3.1. Hamburguer .....	3
3.2. Doenças Veiculadas por hamburguer .....	4
3.3. Variação de temperatura de armazenamento .....	5
3.4. Uso de bioprotetor .....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	8
4.1. Avaliações Microbiológicas .....	9
4.2. Avaliações Físico químicas e tecnologicas.....	10
4.3. Análise Estatística.....	11
5. Resultados e Discursão .....	11
5.1. Avaliação Microbiológica .....	11
5.1.1. Bactéria láctica .....	12
5.1.2. Coliformes totais e termotolerantes .....	14
5.1.3. Mesófilos aeróbios.....	18
5.1.4. Psicrotrófico aerobio gram positivo.....	20
5.1.5. <i>Salmonella</i> spp.....	22
5.1.6. <i>Staphilococcus</i> coagulase positiva .....	22
5.2. Avaliação fisico químicas e tecnológicas.....	23
5.2.1. Paremetro de cor.....	24
5.2.2. Evolução do pH .....	26
5.2.3. Atividade de água (Aw) .....	27
5.2.4. Encolhimento.....	29
5.2.5. Rendimento .....	29

6. Conclusão .....	30
7. Refências Bibliográficas .....	32

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os hábitos alimentares da população sofreram alterações motivadas especialmente pelos processos de urbanização, industrialização, profissionalização das mulheres e diminuição do tempo disponível para a preparação de alimentos e/ou para o seu consumo. Em virtude desta mudança, é cada vez maior o interesse por alimentos industrializados que apresentam maior praticidade, como hambúrguer.

Por ser o hambúrguer, um produto elaborado com carne triturada, vários fatores intrínsecos e extrínsecos contribuem para o surgimento de problemas microbiológicos. Durante o processamento tecnológico de elaboração, diversas etapas envolvem operações de riscos, como a pesagem, moagem, mistura, congelamento e embalagem contribuindo para o incremento de perigos.

O processo de moagem da carne favorece a multiplicação microbiana, uma vez que aumenta a superfície de contato e seu potencial de oxi-redução, garantindo melhores condições de desenvolvimento dos microrganismos aeróbicos e facultativos. Além disso, a carne que possui elevado teor de proteínas, gorduras, pH próximo da neutralidade e elevado valor de atividade de água o que fornece condições nutricionais ótimas de crescimento. Após a moagem, este alimento apresenta também maior suco celular livre (FORSYTHE, 2013; FERREIRA, 2014).

Os níveis de contaminação inicial da carcaça, bem como as práticas de higiene durante a manipulação, o tempo e temperatura de armazenamento, também contribuem para a propagação microbiológica da carne, o que é praticamente inevitável.

O hambúrguer tem como principal método de conservação o emprego de baixas temperaturas como refrigeração e congelamento. A utilização de baixas temperaturas de armazenamento e distribuição é um dos fatores extrínsecos mais importantes no controle da atividade bioquímica dos microrganismos, estando entre os métodos de conservação mais utilizados para alimentos perecíveis. De maneira geral, quanto menor for a temperatura, menor será a velocidade das reações bioquímicas ou das atividades microbianas. Assim o uso do frio em condições ideais pode levar a inibição do desenvolvimento de muitos microrganismos presentes na carne (FERREIRA, 2014). Entretanto, a variação da temperatura durante a

distribuição e o armazenamento dos produtos, favorece o desenvolvimento microbiano que estavam sendo controlado pelo congelamento.

Os consumidores estão cada vez mais informados e exigentes quanto ao consumo de alimentos livres de patógenos, com um mínimo de conservantes e aditivos. Essas exigências direcionam as pesquisas para a busca de técnicas de preservação mais naturais (ALMEIDA, 2015).

A combinação do controle higiênico sanitário da matéria prima e a utilização de tecnologias protetivas, têm sido utilizadas para aumentar a vida de prateleira de produtos cárneos, reduzindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis e patogênicos (COMI *et al.*, 2015). Neste contexto estão as culturas bioprotetoras utilizadas em diferentes estudos (BERNARDI e GOLONELI, 2010; WANG *et al.*, 2013; COMI, *et al.*, 2015). As culturas bioprotetoras são bactérias benéficas que tem se tornado uma ferramenta importante para produzir produtos seguros, com vida útil estável. Na produção de produtos cárneos, os principais microrganismos empregados são estafilococos coagulase negativa e bactérias lácticas, por conferirem ao produto melhor cor, aroma, textura e controle microbiológico.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Considerando que a segurança microbiológica de hambúrgueres é garantida principalmente pela refrigeração/congelamento e sabendo-se que a temperatura pode variar durante o armazenamento, o principal objetivo deste trabalho é avaliar a utilização de cultura bioprotetora em condições de abuso de temperatura.

#### **2.1.1. Objetivos Específicos**

- Avaliar o desenvolvimento da cultura bioprotetora durante o período de armazenamento de hambúrguer;

- Avaliar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis durante o armazenamento de hambúrguer adicionado de cultura bioprotetora, sob condições de descongelamento/congelamento;
- Avaliar o efeito da utilização de cultura bioprotetora sobre as características tecnológicas de hambúrguer.

### **3. REFERÊNCIAL TEÓRICO**

#### **3.1. Hambúrguer**

O Brasil é um grande fornecedor de proteína animal para o mundo. Estudos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) revelam que no período de 2000 a 2015 a produção de carne teve aumento de 45%. O país tem cerca de 214 milhões de cabeças de gado, o maior rebanho comercial bovino do mundo e em 2015, a produção foi de 9,2 milhões de toneladas de carne (BRASIL, 2016).

As tendências de “conveniência e praticidade” são motivadas, principalmente, pelo ritmo de vida nos centros urbanos e pelas mudanças verificadas na estrutura tradicional das famílias, fatores que estimulam a demanda por produtos que permitem a economia de tempo e esforço dos consumidores (BARBOSA et al. 2010).

A carne além de ser fonte de proteína com alto valor biológico, vitaminas do complexo B e de minerais (ferro e zinco) é bastante versátil para produção de vários produtos cárneos (ALMEIDA, 2011). A variedade de produtos cárneos que não demandam muito tempo para o preparo, disponibilizada nas gôndolas de supermercados, tornou-se um atrativo para os consumidores, contribuindo para que salsicha, salame, mortadela, linguiça, empanado, almôndegas e hambúrguer sejam opção crescente para o lanche de muitas famílias no mundo todo. Em decorrência da sua praticidade de preparo e por possuir nutrientes que alimentam e saciam a fome rapidamente, o hambúrguer se tornou um produto consumido por todas as classes populares (OLIVEIRA et al., 2013).

De acordo com a legislação brasileira, hambúrguer é um ‘produto cárneo industrializado, obtido de carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico

adequado. Trata-se de produto cru, semifrito, cozido, frito, congelado ou resfriado', conforme a sua classificação (BRASIL, 2000).

Segundo Costa (2004), com a industrialização da carne, o hambúrguer é uma alternativa para o aproveitamento das carnes menos nobres, o que vem aumentar o lucro dos abatedouros.

### **3.2. Doenças veiculadas por hambúrguer**

A vigilância sanitária é de competência do poder público, entretanto é evidente a necessidade de uma ação conjunta dos usuários, dos profissionais da área, das entidades, das organizações populares para um trabalho integrado objetivando o cumprimento das leis de proteção ao consumidor (ALMEIDA, et al. 2010).

A carne *in natura* resfriada fica exposta a contaminações em todas as fases de seu processamento, podendo ser um veículo de microrganismos patogênicos e causadores de doenças alimentares (DORTA, KADOTA e NAKAMATSU, 2015).

Embora algumas das alterações do produto não se devam apenas à atuação de microrganismos, a multiplicação microbiana é o fator mais importante que influencia a qualidade da carne (GOMIDE, RAMOS e FONTES, 2013).

A carne bovina em cortes e moída *in natura* tem sido reconhecida como fonte primária de infecção quando manipulada incorretamente, ocasionando graves consequências à saúde humana, tanto para os próprios manipuladores como para os consumidores (ALMEIDA et al., 2010). Ainda segundo Almeida et al., (2010) pesquisas apresentaram resultados preocupantes quanto ao nível de contaminação das carnes, dos equipamentos, utensílios e manipuladores, assim como pela adoção de práticas inadequadas de manipulação de alimentos.

A carne picada utilizada para a produção de hambúrguer, em particular, é um substrato potencialmente perigoso para a multiplicação bacteriana e tem uma vida útil muito curta (ANDRITSOS, 2012). A contaminação da carne moída pode ocorrer durante a moagem, pois, na maioria das vezes, os cortes utilizados são excessivamente manipulados e com tecidos gordurosos, os quais podem conter nódulos linfáticos com microrganismos em seu interior. Depois do processo da moagem, a carne possui maior área superficial exposta, e, mesmo sendo mantida sob refrigeração, microrganismos deteriorantes podem continuar a se desenvolver. A

microbiota normal de produtos à base de carne bovina moída sob condições higiênicas é composta, predominantemente, por bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas* e por Gram-positivas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus*. As bactérias patogênicas ou potencialmente mais comuns nestes alimentos são algumas estirpes de *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp*, e, ocasionalmente, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus* (JAY, 2005).

Em estudos realizados por Fortuna (2013), foi encontrado altas contagens de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e também contaminação por *Salmonella spp*. em hambúrgueres. A contaminação deste produto por *Salmonella spp*. é muito preocupante devido ao aumento do risco de surtos de salmoneloses em humanos caso estes alimentos sejam consumidos após uma cocção insuficiente ou contaminação cruzada com outros alimentos durante a preparação.

Considerando as excelentes condições oferecidas pelo produto para o desenvolvimento microbiano, tem sido verificado, surtos de toxinfecções alimentares envolvendo o consumo de hambúrgueres que foram preparados com carne contaminada com microrganismos patogênicos e/ou submetidos a um tratamento térmico inadequado.

A avaliação higiênico-sanitária de onze marcas comerciais brasileiras de hambúrguer mostrou que sete amostras da mesma marca apresentaram valores para estafilococos coagulase positiva acima dos padrões permitidos; três marcas apresentaram contagens acima do estipulado para *Clostridium* sulfito redutor a 46°C e uma das marcas apresentou resultado positivo para *Salmonella spp.*, apresentando riscos para a saúde do consumidor (DUCATTI et al., 2014).

### **3.3. Variação da temperatura de armazenamento**

O comércio varejista de produtos cárneos e as condições durante o transporte estão fora do controle direto do fabricante e muitas vezes diferentes das especificações da embalagem, representando um ponto crítico importante no que diz respeito ao controle higiênico-sanitário de manuseio e armazenamento destes

produtos (FORTUNA, NASCIMENTO e FRANCO 2013; NYCHAS et al., 2008).

A comercialização de hambúrgueres em açougues e/ou supermercados está sendo procedida de forma equivocada pelos comerciantes, pois estes, em sua maioria, comercializam os hambúrgueres em balcões frigoríficos que não atingem a temperatura ideal de armazenamento do produto, indicada no rótulo pelos próprios fabricantes, que é de no máximo  $-12^{\circ}\text{C}$  (FORTUNA, NASCIMENTO e FRANCO, 2013). De acordo com Casarim (2005), os hambúrgueres devem ser mantidos e armazenados em temperaturas de aproximadamente  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Quando a temperatura de comercialização do hambúrguer não é adequada, as amostras encontram-se resfriadas e isto ocasiona perda da sua estrutura rígida que, aliada à temperatura inadequada, favorece a multiplicação dos microrganismos (MENEZES e ALEXANDRINO, 2014). Sendo assim, estes produtos atingem temperaturas ótimas para a multiplicação da microbiota já existente na carne, podendo aumentar o risco de toxinfecções alimentares (FORTUNA, NASCIMENTO e FRANCO, 2013).

Segundo um estudo realizado pelo Inmetro, onde foram medidas as temperaturas de freezers de 31 supermercados, 27 foram considerados não conformes, pois apresentavam a temperatura de conservação dos alimentos congelados, acima do valor máximo determinado pela legislação colocando em risco a saúde do consumidor. É importante que todos os alimentos acondicionados a temperaturas acima de  $-8^{\circ}\text{C}$  sejam inutilizados para o consumo pelo supermercado, pois o descongelamento e posterior recongelamento do alimento compromete a integridade do mesmo e, além da perda de nutrientes, aumenta as chances de multiplicação microbiana (BRASIL, 2005).

Assim, apesar dos esforços realizados pela indústria, torna-se difícil evitar a contaminação da carne. Além disto, a melhora na qualidade higiênico-sanitária dos produtos melhora o controle microbiano e minimiza a contaminação do produto final, reduzindo a incidência de patógenos e aumentando o prazo de validade dos produtos (CÁRCEL et al., 2015).

De acordo com Ribeiro (2006), o estudo de simulação do descongelamento é particularmente importante quando a principal barreira que controla o desenvolvimento microbiano é a temperatura de armazenamento.

### 3.4. Uso de Bioprotetores

Dentre os métodos de controle do desenvolvimento microbiano em produtos alimentícios, destacam-se as tecnologias naturais baseadas na utilização de culturas bioprotetoras, compostos antimicrobianos naturais tais como óleos essenciais ou enzimas e bacteriocinas, as quais podem ser utilizadas de forma isolada ou combinada, garantindo efeito sinérgico (SCHILLINGER E HOLZAPFEL, 2006).

Recentemente, combinações de controle de qualidade, higiene e tecnologia de proteção têm sido usadas para melhorar e prolongar a vida de prateleira de carnes e produtos derivados, limitando a multiplicação de bactérias patogênicas e sua deterioração (COMI et al., 2011 e VASILOPOULOS et al., 2010).

Geralmente as culturas bioprotetoras são empregadas com o propósito de alterar de forma benéfica as propriedades dos alimentos, dentre os quais, as carnes e os produtos cárneos. A adição destes microrganismos apresenta quatro objetivos principais: (1) melhorar a segurança do produto por meio do controle de patógenos pela competição entre eles, (2) estender a vida útil do produto pela inibição de microrganismos deteriorantes, (3) diversificar o produto, modificando a matéria-prima, a fim de se obter novas propriedades sensoriais e (4) promover benefícios à saúde por meio de efeitos positivos na microbiota intestinal (LÜCKE, 2000).

O uso de cultura bioprotetora na elaboração de produtos cárneos é uma prática comum na indústria alimentícia estando relacionada às características de *flavor*, textura e com a vida útil do produto final (BOMDESPACHO, 2010). A combinação mais apropriada de microrganismos na formulação de cultura bioprotetora é de fundamental importância para se obter produtos com a qualidade esperada (BERNARDI e GOLINELI, 2010).

De acordo com Pothakosa et al. (2015), as bactérias lácticas possuem função bioprotetora na carne devido exercerem atividade antagonista contra outros microrganismos indesejáveis.

Em hambúrgueres, o uso de misturas de culturas bioprotetoras, composta por diferentes microrganismos determinam uma melhor qualidade microbiológica e físico-química dos produtos, influenciando, inclusive, o sabor e o odor. Por esta razão, a vida de prateleira dos produtos é prolongada (COMI et al., 2015).

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – *Campus* Rio Pomba. Os experimentos foram conduzidos em três repetições e as análises em duplicata.

Os hambúrgueres foram elaborados no Setor de Processamento de Carnes, as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e as análises físico-químicas e tecnológicas no laboratório de Análise Físico-Química de Alimentos.

Para elaboração dos hambúrgueres foi utilizada uma mesma mistura de ingredientes cárneos e não cárneos para os três tratamentos. A carne e a gordura foram moídas em disco de 5 mm. A proteína de soja foi hidratada com água, na proporção de 1 parte de proteína para 3 partes de água (1 Kg proteína + 3 Kg de água). As matérias-primas cárneas e não cárneas utilizadas (Tabela 1) foram misturadas por 10 a 15 minutos, até obter massa homogênea, com “liga” adequada.

**Tabela1- Ingredientes cárneos e não cárneos utilizados na fabricação do hambúrguer**

<b>Matéria prima</b>	<b>% de Matéria Prima em relação ao produto final</b>
Carne bovina magra	62
Toucinho	15
Tripolifosfato de sódio	0,3
Eritorbato de sódio e açúcar	0,3
Glutamato monossódico	0,3
Proteína de soja hidratada	12 (2,3 proteína e 9,7 água)
Alho batido	0,5
Cebola picada	1,5
Sal	2,3
Água	5,8
Total	100

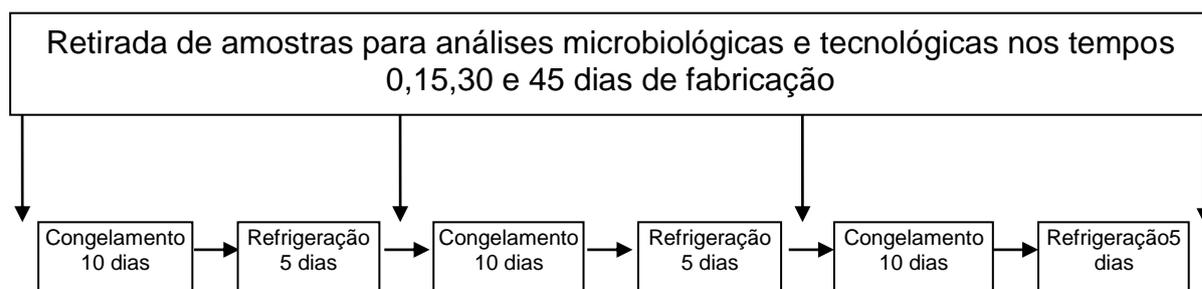
Após a homogeneização, a massa foi dividida e direcionada aos três diferentes tratamentos:

**Tratamento 1 – Controle:** hambúrguer submetido ao congelamento.

**Tratamento 2 – Congelamento/descongelamento:** hambúrguer submetido ao congelamento e sucessivos descongelamentos com o objetivo de avaliar o comportamento da microbiota natural da carne sob condições de abuso de temperatura.

**Tratamento 3 – Congelamento/descongelamento + adição de cultura bioprotetora:** hambúrguer elaborado com adição de cultura iniciadora **Lyocarni BXH-69** gentilmente fornecida pela empresa Sacco Brasil e submetido às condições de abuso de temperatura. A cultura bioprotetora, cuja finalidade é inibir a microbiota deteriorante em produtos cárneos frescos ou curados, composta por estirpes de *L. sakei* que se multiplicam em temperaturas baixas de até 2°C e *Staphylococcus xylosus*, foi utilizada na dose indicada pelo fabricante (20 gramas de cultura para 100 Kg de carne).

Após a fabricação, os produtos foram embalados individualmente em embalagens de polietileno de baixa densidade. Os produtos obtidos no tratamento 1 permaneceram em temperatura de congelamento (-18 °C) e os obtidos nos tratamentos 2 e 3 foram submetidos a uma simulação de descongelamento (7 °C), conforme apresentado na Figura 1.



**Figura 1- Simulação dos períodos de descongelamento dos hambúrgueres.**

Imediatamente após a fabricação e a cada 15 dias, foram retiradas amostras de cada um dos três tratamentos para as determinações microbiológicas, físico-químicas e tecnológicas.

#### **4.1. Avaliações Microbiológicas:**

A viabilidade da cultura láctica tem por objetivo avaliar o desenvolvimento dos microrganismos da cultura iniciadora Lyocarni BXH-69, de modo comparativo com os tratamentos que não foram adicionados a cultura. Foi determinada utilizando-se meio de cultura de Man Rogosa Sharpe (MRS), sendo as placas incubadas a 38 °C por 48 a 72 horas (RICHTER e VEDAMUTHU, 2001).

Para avaliação do efeito bioprotetor da cultura bioprotetora adicionada, foram realizadas as determinações microbiológicas de coliformes totais e a 45 °C, *Salmonella* sp., estafilococos coagulase positiva, aeróbios mesófilos e psicotróficos, conforme instrução normativa 62 (BRASIL, 2003), sendo as análises de psicotróficos realizadas em Ágar Macconkey, seletivo para Gram-negativos. Esta modificação foi necessária para garantir que a cultura iniciadora não fosse quantificada, uma vez que é composta por *L. sakei*, microrganismo Gram-positivo que se desenvolve sob refrigeração.

#### **4.2. Avaliações Físico Químicas e tecnológicas:**

A cor dos hambúrgueres foi determinada em colorímetro Miniscan Hunterlab, por meio do sistema CIE (Commission Internatinal de l'Eclairage) L\* (luminisidade), a\* (verde ao vermelho) e b\*(azul ao amarelo). Os parâmetros de cor analisados para os hambúrgueres foram L\*, a\* e b\*. Os valores de L\* variam do claro ao escuro, sendo o valor 100 correspondente à cor branca e o valor 0 (zero) à cor preta. Os valores de a\* e b\* representam os níveis de tonalidade e saturação, sendo que quanto mais positivo o valor de a\*, maior a tendência para a cor vermelha e quanto mais negativo, maior tendência ao verde. Para o parâmetro b\*, quanto mais positivo maior tendência ao amarelo e quanto mais negativo, maior tendência ao azul. Portanto, quando se reduz o valor de L\* significa que a carne está mais “escura” e a redução do valor de a\* significa que a carne está mais “verde” e menos “vermelha”. Quando se reduz o valor de b\* indica que a carne está mais “azul” e menos “amarela”.

A determinação de pH foi realizada conforme metodologia proposta por Terra, Fries e Terra (2004).

A atividade de água foi determinada eletronicamente em aparelho Aqualab.

O rendimento por cocção e a porcentagem de encolhimento foram quantificados de acordo Berry (1992), utilizando-se as equações 1 e 2, respectivamente.

$$\% \text{ Rendimento de Cocção} = \frac{\text{Peso da amostra após fritura}}{\text{Peso da amostra antes fritura}} \times 100 \quad \text{Eq (1)}$$

Percentual de rendimento na cocção

$$\% \text{ Encolhimento} = \frac{(\text{Diâmetro da amostra antes fritura} - \text{Diâmetro da amostra após fritura})}{\text{Diâmetro da amostra antes fritura}} \times 100 \quad \text{Eq (2)}$$

Porcentagem de encolhimento

### 4.3. Análise Estatística

O experimento foi montado segundo o esquema fatorial (3x4) sendo três tratamentos e quatro tempos de armazenamento, no delineamento inteiramente casualizado (D.I.C.), com três repetições.

Os dados foram interpretados por meio da análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey a 1% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliações Microbiológicas

Na Tabela 2 encontra-se o resumo da análise de variância das médias dos logaritmos das contagens de bactérias lácticas, coliformes totais, coliformes a 45°C, aeróbios mesófilos e psicrotróficos, nos tempos 0 e após 15, 30 e 45 dias de armazenamento.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância dos valores do logaritmo das contagens de bactérias lácticas (BAL), coliformes totais (colif. totais), coliformes a 45°C (colif. 45°C), aeróbios mesófilos (Mes.) e psicrotróficos (Psic) em função dos tratamentos (Trat.) e do período de armazenamento (Dias).

FV	GL	Quadrado Médio				
		BAL	Colif.totais	Colif. 45°C	Mes	Psic
Trat	2	15,1072**	1,3710**	0,4471**	7,1564**	3,2496**
Dias	3	0,0091 <sup>ns</sup>	0,2636**	0,4461**	2,1263**	1,3895**
Trat x D	6	1,6661**	0,5143**	0,1099**	0,7136**	1,1335**
Erro	24	0,1384	0,0392	0,0296	0,1111	0,2840

\*\*F significativo a 1% de probabilidade (P<0,01).

ns F não significativo a 1 % de probabilidade.

### 5.1.1. Bactérias Lácticas

A análise de variância dos resultados (Tabela 2) indicou interação significativa entre os tratamentos e dias de armazenamento (P<0,01) e efeito de tratamentos (P<0,01). Entretanto não indicou efeito significativo (P>0,01) para dias de armazenamento em relação ao desenvolvimento de bactérias lácticas.

O teste de Tukey (Tabela 3) mostrou diferença significativa (P<0,01) entre todos os tratamentos a partir de 30 dias de armazenamento, sendo o produto elaborado com adição da cultura iniciadora (Tratamento 3) o que apresentou maior média, seguido do produto que também foi submetido ao abuso de temperatura, porém não adicionado de cultura iniciadora (Tratamento 2).

**Tabela 3.** Resultados médios da contagem de bactérias lácticas (Log UFC.g<sup>-1</sup>) das amostras de hambúrgueres ao longo do armazenamento

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
1	5,95A a	5,40Aa	4,30Ab	4,39Ab
2	6,02A a	6,28B a	6,52B a	6,32B a
3	6,57A a	6,82B ab	7,63C bc	7,96C c

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,01)

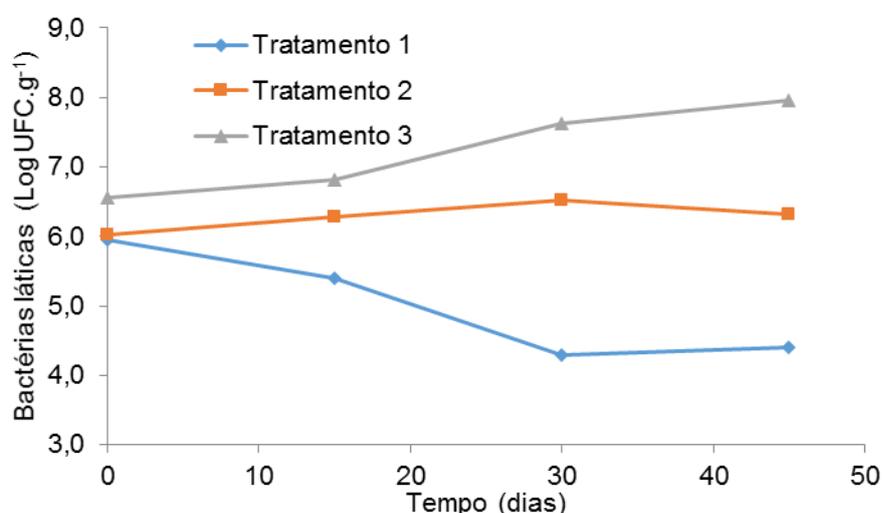
Ao final de 45 dias de armazenamento os produtos adicionados de cultura bioprotetora (tratamento 3) apresentaram um aumento de 1,64 ciclos log na contagem de bactérias lácticas quando comparado ao tratamento 2, que também foi mantido sob as mesmas condições, mas não adicionado da cultura. Este aumento no número de bactérias lácticas no tratamento 3, demonstra que a cultura iniciadora se desenvolveu no produto, o que é importante para que ela tenha efeito bioprotetor.

Milani et al. (2003), quando analisaram linguiça de frango adicionadas de cultivos iniciadores e armazenadas à 8 °C, encontraram para as linguiças controle, valores superiores a  $10^7$ UFC/g de bactérias lácticas após 6 dias de armazenamento e para as linguiças contendo culturas bioprotetoras, contagens de aproximadamente,  $10^9$ UFC/g.

Os valores encontrados por estes autores são superiores aos encontrados no presente estudo, entretanto é necessário considerar que as linguiças permaneceram em temperatura de refrigeração durante todo o estudo, não sendo submetidas ao congelamento.

Comi et al. (2015) estudaram por 12 dias o desenvolvimento de diferentes culturas bioprotetoras em hambúrgueres armazenados a 4 °C, encontrando no produto adicionado de *L. sakey* subsp *carneus*/ *L. sakey* + *S. xylosum* na proporção 1:1, valores de bactérias lácticas de 4,9 log UFC/g logo após a fabricação a 8,90 log UFC/g após 12 dias de armazenamento.

O desenvolvimento de bactérias lácticas em função do período de armazenamento é apresentado na Figura 2.



**Figura 2.** Desenvolvimento de bactérias lácticas durante o armazenamento de hambúrgueres.

Para que uma cultura tenha efeito bioprotetor sobre o alimento é necessário que os microrganismos se desenvolvam ou permaneçam viáveis nos produtos durante o período de armazenamento, o que depende da matriz do produto.

As bactérias lácticas podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de vários mecanismos: competição por

oxigênio, competição por sítios ativos de ligação e produção de substâncias antagonísticas, especialmente ácidos e bacteriocinas (LÜCKE, 2000).

Segundo Franco e Landgraf (2008), entre os microrganismos contaminantes na carne, destacam-se as bactérias lácticas (*Lactobacillus*) por apresentar características de crescimento ideal nas condições de anaerobiose, apontando maiores contagens no interior do produto. Os resultados obtidos no presente estudo, vai de encontro com esta afirmativa, pois o tratamento 2 mesmo sem ter a adição de culturas bioprotetoras apresentou contagens de bactérias lácticas, que são provavelmente provenientes de contaminação durante o processamento e/ou das matérias primas.

A deterioração de produtos cárneos por bactérias lácticas resulta na produção de limosidade, sabores e odores desagradáveis, descoloração, produção de gás e diminuição do pH (BORCH et al., 1996). Dentre o grupo de bactérias lácticas, os mais frequentes em carne pertencem aos gêneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (NYCHAS et al., 2008).

### **5.1.2. Coliformes totais e termotolerantes (45°C)**

A análise de variância dos resultados (Tabela 2) indicou interação significativa entre os tratamentos e dias de armazenamento ( $P < 0,01$ ) e efeito de tratamentos e de dias de armazenamento ( $P < 0,01$ ) para coliformes totais e coliformes a 45°C (termotolerantes).

Para coliformes totais (Tabela 4), o teste de Tukey mostrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $P > 0,01$ ) nos tempos 0 e após 15 de armazenamento. Entretanto após 30 e 45 dias de armazenamento o tratamento 2, que corresponde ao hambúrguer elaborado sem adição da cultura bioprotetora e submetido ao abuso de temperatura apresentou a maior média de contagem para coliformes totais diferindo significativamente ( $P < 0,01$ ) dos demais tratamentos. Os hambúrgueres adicionados de cultura bioprotetora e submetidos ao abuso de temperatura (Tratamento 3) não diferiram significativamente ( $P > 0,01$ ) dos produtos que foram mantidos congelados durante todo o período estudado. Estes resultados demonstram que a cultura bioprotetora foi efetiva para o controle deste grupo

microbiano quando os produtos foram submetidos à sucessivos descongelamentos durante o armazenamento.

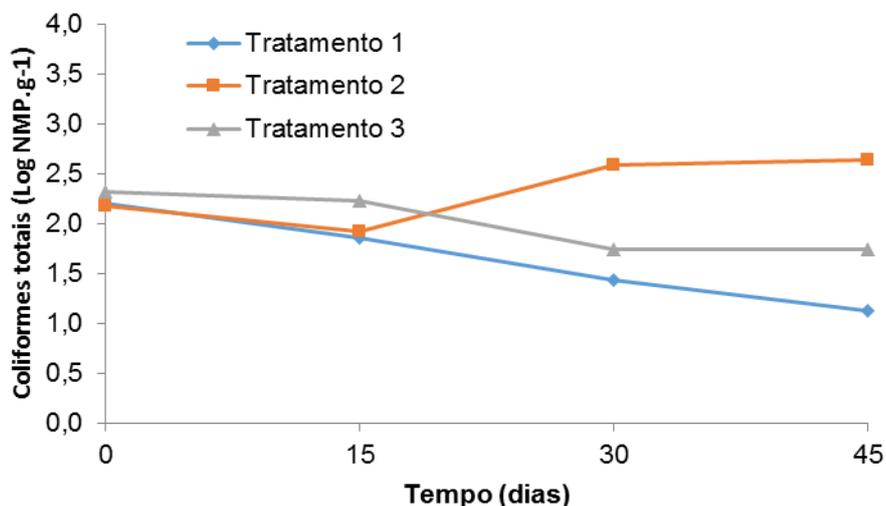
**Tabela 4.** Resultados médios da contagem de coliformes totais (Log NMP/g) das amostras de hambúrgueres ao longo do armazenamento

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
1	2,20A a	1,86A ab	1,43A bc	1,13A c
2	2,18A ab	1,93A a	2,59B bc	2,63B c
3	2,32A a	1,23A a	1,74A b	1,74A b

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,01$ ).

Em relação aos dias de armazenamento, observou-se (Tabela 4) uma redução no número de coliformes totais ao longo do armazenamento para os produtos que foram mantidos congelados (Tratamento 1) e que foram submetidos ao abuso de temperatura e adicionados de cultura bioprotetora (Tratamento 3) a partir de 30 dias de armazenamento. Para o tratamento 2, foi observado um aumento na população de coliformes totais ao longo do período de armazenamento.

A evolução do desenvolvimento de coliformes totais em função dos tratamentos e dias de armazenamento pode ser observada na Figura 3.



**Figura 3** – Desenvolvimento de coliformes totais durante o armazenamento de hambúrgueres.

A RDC nº 12, de 02/01/2001 (BRASIL, 2001) não estabelece limites de tolerância para o grupo dos coliformes totais em hambúrgueres “in natura”. Entretanto, a presença desses microrganismos pode indicar condições higiênico-sanitárias deficientes, colocando em risco a saúde dos consumidores (MENEZES E ALEXANDRINO, 2014)

Independente do tratamento, os valores encontrados estão entre os observados por Martins et al. (2013), que ao analisarem coliformes totais em amostras de hambúrgueres encontraram valores entre 2,91 e 0,85 logNMP/g. Menezes e Alexandrino (2014), encontraram valores de 3,04 log NMP/g para coliformes totais em amostras de hambúrguer comercializados na cidade de Campo Mourão.

Em relação a coliformes termotolerantes, Tabela 5, o teste de Tukey mostrou que não houve diferença ( $P>0,01$ ) significativa entre os tratamentos 1 e 3 durante todo o período estudado. Nos tempos 15, 30 e 45 dias de armazenamento, os hambúrgueres submetidos ao abuso de temperatura e não adicionados de cultura bioprotetora (Tratamento 2) diferiram dos demais tratamentos ( $P<0,01$ ), apresentando maior número de coliformes termotolerantes.

Estes resultados demonstram o risco do descongelamento dos produtos durante o armazenamento, a importância da manutenção da temperatura de congelamento durante a estocagem dos produtos e a possibilidade de incremento na segurança microbiológica pela utilização da cultura bioprotetora.

**Tabela 5.** Resultados médios da contagem de coliformes termotolerantes (Log UFC.g<sup>-1</sup>) das amostras de hambúrgueres ao longo do armazenamento

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
1	1,30A a	0,83A b	0,77A b	0,74A b
2	1,30A a	1,27B a	1,24B a	1,30B a
3	1,58A a	0,76A b	0,83A b	0,83A b

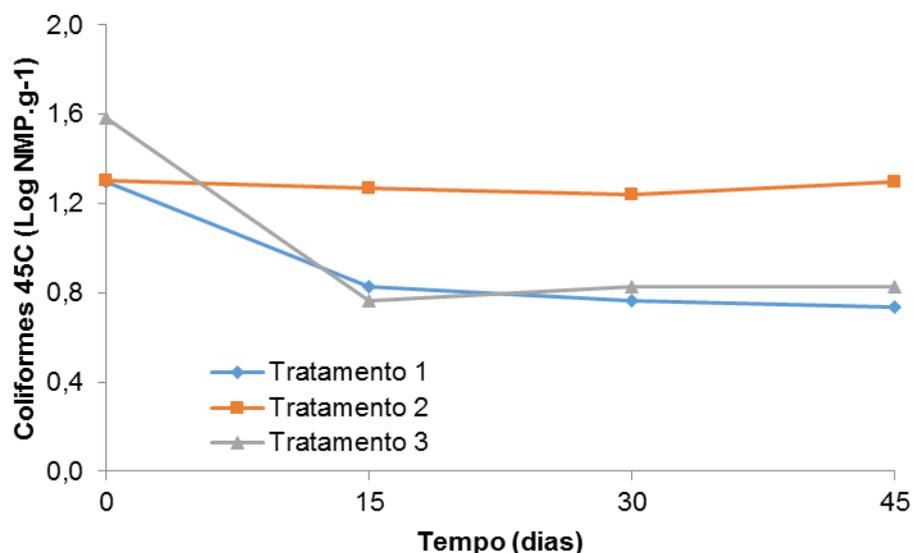
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,01$ )

Considerando o período de armazenamento, observa-se a manutenção do NMP inicial de coliformes termotolerantes no tratamento 2 e uma redução significativa entre os tempos 0 e 15 dias para os tratamentos 1 e 3. A utilização da cultura bioprotetora possibilitou a obtenção de produtos com características semelhantes aos produtos mantidos congelados, no que se refere a coliformes termotolerantes, mesmo sendo submetidos ao abuso de temperatura.

Em alimentos frescos de origem animal, a ocorrência de números elevados de coliformes pode indicar manipulação inadequada, sem cuidados de higiene e/ou armazenamento inadequado, podendo levar a infecção alimentar (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

Todos os tratamentos encontram-se de acordo com o estabelecido pela RDC n° 12, de 02/01/01 (Brasil, 2001) para coliformes termotolerantes, que estabelece um valor de no máximo  $5 \times 10^3$  NMP/g, demonstrando que, independente do tratamento empregado, os produtos foram elaborados dentro dos preceitos das boas práticas de fabricação.

A evolução do desenvolvimento de coliformes termotolerantes pode ser observada na Figura 4.



**Figura 4** – Número mais provável de coliformes termotolerantes durante o armazenamento de hambúrgueres.

Foi objeto de estudo de Sales et al. (2016) a determinação de coliformes totais e termotolerantes em hambúrgueres vendidos em *fast foods* na cidade de

Curitiba – PR e foi constatada ausência de coliformes totais e termotolerante nas 10 amostras estudadas.

A utilização de *L. sakei* na fermentação de salsichas foi avaliada por Wang et al. (2013). Os autores verificaram que a utilização desta cultura *starter* desempenhou um papel decisivo no controle de *E. coli* e de bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Além disto, os produtos elaborados com adição desta cultura iniciadora apresentaram maior qualidade microbiológica e maior vida de prateleira que as salsichas fermentadas espontaneamente.

Segundo Ribeiro (2006), a ação inibitória de bactérias lácticas sobre os coliformes totais, pode refletir na diminuição do número de células viáveis das linhagens patogênicas de *E. coli* e outras enterobactérias que possam estar presentes no alimento, o que colaboraria com a inocuidade deste produto de uma forma mais “natural”, com uso reduzido de produtos químicos.

### 5.1.3. Mesófilos Aeróbios

A análise de variância dos resultados (Tabela 2) indicou interação significativa entre os tratamentos e os dias de armazenamento ( $P < 0,01$ ) e efeito de tratamentos e de dias de armazenamento ( $P < 0,01$ ) para microrganismos aeróbios mesófilos.

O teste de Tukey (Tabela 6) mostrou que o tratamento 3 (adicionado da cultura bioprotetora) apresentou maior média de microrganismos aeróbios mesófilos nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento, diferindo significativamente dos demais tratamentos ( $P < 0,01$ ). Não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre os tratamentos 1 e 2 até 30 dias de armazenamento. Entretanto, com 45 dias de armazenamento, o tratamento 1 diferiu dos demais tratamentos ( $P < 0,01$ ), apresentando menor contagem deste grupo microbiano.

**Tabela 6.** Resultados médios da contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (Log UFC.g<sup>-1</sup>) das amostras de hambúrgueres ao longo do armazenamento.

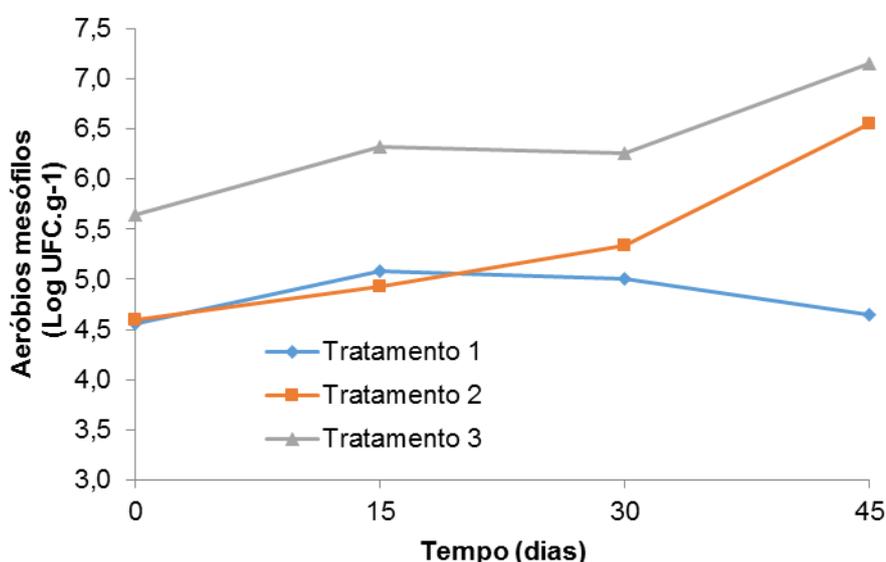
Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
1	4,56A a	5,08A a	5,00A a	4,65A a
2	4,60A a	4,92A a	5,34A a	6,55B b
3	5,64B a	6,32B a	6,26B a	7,15B b

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,01$ ).

O maior desenvolvimento de aeróbios mesófilos nos produtos obtidos pelo tratamento 3 pode estar relacionado ao desenvolvimento da cultura bioprotetora adicionada, uma vez que no tempo 0, este microrganismo apresentou maior média desta contagem microbiana. A cultura adicionada é composta por *L. sakei* e *S. xylosus* os quais podem se desenvolver respectivamente, em temperatura de 8 e 15 °C e 5-45 °C.

Observa-se, entretanto, que após 45 dias de armazenamento, o tratamento 2 não diferiu ( $P> 0,01$ ) do tratamento 3 e que ocorreu um aumento significativo de mesófilos aeróbios no tratamento 2, entre os tempos 30 e 45 dias, demonstrando a vulnerabilidade do produto que sofreu abuso de temperatura ao desenvolvimento de microrganismos aeróbios mesófilos. No produto que permaneceu congelado durante o armazenamento (tratamento 1) a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos permaneceu a mesma durante os 45 dias de armazenamento.

A evolução de bactérias aeróbias mesófilas nos produtos é apresentada na Figura 5.



**Figura 5** – Desenvolvimento de mesófilos aeróbios durante o armazenamento de hambúrgueres.

O uso do frio em condições ideais pode levar a inibição de uma vasta gama de microrganismos presentes na carne (FERREIRA, 2014), isso explica o comportamento do tratamento 1.

A qualidade microbiológica de cinco marcas de hambúrgueres industrializados comercializados em Alfenas-MG foi avaliada por Melo et al. (2012), sendo encontrada elevadas contagens de aeróbios mesófilos: marca “A” média de 5,4 log UFC/g; marca “B”: 5,3 Log UFC/g; marca “C”: 8,4 Log UFC/g; marca “D”: 5,2 Log UFC/g e marca “E”: 7,7 Log UFC/g.

A legislação, RDC 12 de 02/01/2001, não estabelece padrão microbiológico para aeróbios mesófilos em hambúrgueres, entretanto, a maioria dos patógenos encontrados em alimentos são mesófilos e o desenvolvimento deste grupo microbiano além de possibilitar maior deterioração dos produtos, aumenta o risco de veiculação de doenças.

#### 5.1.4. Microrganismos Aeróbios Psicotróficos Gram-negativo

A análise de variância dos resultados (Tabela 2) indicou interação significativa entre os tratamentos e os dias de armazenamento ( $P < 0,01$ ) e efeito de tratamentos e de dias de armazenamento ( $P < 0,01$ ) para microrganismos aeróbios psicotróficos.

O teste de Tukey mostrou que não houve diferença significativa ( $P > 0,01$ ) entre os tratamentos 1 (congelado) e 3 (submetido ao abuso de temperatura e adicionado de cultura bioprotetora) nos tempos 0, 15 e 45 dias de armazenamento. O tratamento 2 apresentou maior média de contagem de psicotróficos Gram-negativos durante todo o período estudado (Tabela 7).

**Tabela 7.** Resultados médios da contagem de aeróbios psicotróficos Gram negativos (Log UFC.g<sup>-1</sup>) das amostras de hambúrgueres ao longo do armazenamento

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
1	4,29A a	4,12 A a	4,11 A a	3,92A a
2	4,51A a	4,37 A ab	5,44B bc	6,49B c
3	4,13A a	4,29 A a	4,61AB a	4,68A a

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,01$ )

Estes resultados demonstram o efeito antagonístico promovido pela cultura iniciadora frente aos contaminantes psicotróficos no hambúrguer. A utilização de

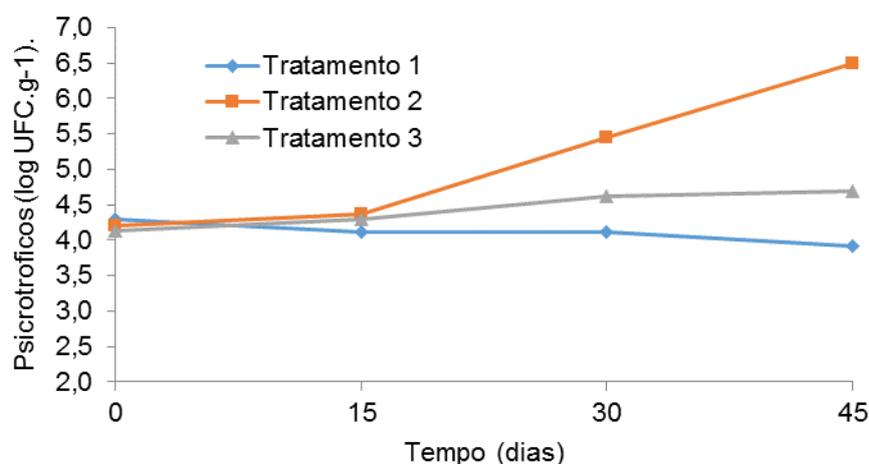
meio seletivo para microrganismos Gram-negativos foi importante para prevenir a quantificação da bacteria iniciadora *L. sakei* que apresenta capacidade de desenvolvimento sobre refrigeração. Desta forma, foi possível quantificar apenas os microrganismos contaminantes psicotróficos.

A elevada contagem desses microrganismos influencia diretamente na vida de prateleira dessas carnes, pois mesmo mantidas sob refrigeração, as mesmas com elevadas contagens de psicotróficos deterioram-se mais rapidamente.

O armazenamento de carnes e produtos cárneos refrigerados possibilita o desenvolvimento de microrganismos aeróbio psicotróficos. Os bacilos Gram-negativos crescem rapidamente nestas condições, podendo ser responsáveis pelas alterações nestes produtos (Jay, 2005).

A deterioração da carne e dos produtos cárneos é fortemente determinada pelo crescimento de bactérias na superfície da carne. Os tipos de microrganismos deterioradores que se desenvolvem em carnes resfriadas são determinados pelas condições de estocagem. As baixas temperaturas prolongam o tempo de estocagem das carnes, porém as mais baixas temperaturas possíveis sem causar o congelamento (-1,5°C) ainda são mais altas que a temperatura mínima para o crescimento de algumas bactérias psicotróficas (HOLLEY e GILL, 2005).

A contagem de psicotróficos inferior a 2 log UFC/g indica baixa contaminação, contagens entre 3 e 4 log UFC/g indicam contaminação intermediária e contagens entre 5 e 6 log UFC/g indicam alta contaminação (FUNG et al., 1980). A tabela 5 apresenta contagens de microrganismos psicotróficos.



**Figura 6** – Desenvolvimento de microrganismos aeróbicos psicotróficos durante o armazenamento de hambúrgueres.

### **5.1.5. *Salmonella* spp.**

Não foi encontrado a presença de *Salmonella* sp. em nenhuma das amostras, estando os produtos de acordo com o preconizado pela RDC 12 de 02/01/2001, que estabelece ausência deste microrganismo em 25 g de amostra.

Salmonelas são microrganismos mesofílicos, com temperatura ótima de desenvolvimento na faixa de 35 °C a 40 °C. No entanto, alguns sorovares são capazes de se multiplicar em temperaturas mais elevadas (<54 °C), podendo se multiplicar em temperaturas de refrigeração. São sensíveis ao calor e geralmente são eliminadas pelo aquecimento a 60° C, por 15-20 minutos. O congelamento provoca uma redução significativa do número de células viáveis, mas não a eliminação completa. Apresentam pH ótimo de multiplicação entre 6,5 e 7,5 (FORSYTHE, 2013).

Melo et al. (2012), também não verificaram presença de *Salmonella* spp. em nenhuma das cinco marcas de hambúrgueres industrializados comercializados na cidade de Alfenas-MG.

Velho et al. (2015) avaliaram a qualidade da carne bovina *in natura* comercializado em Mossoró-RN e verificaram a presença de *Salmonella* sp. na carne de cinco (63%) dos oito supermercados pesquisados, em pelo menos uma das três amostras coletadas.

Das trinta e cinco amostras de carne *in natura* analisadas por Silvestre et al (2013), três amostras de feiras-livres (8,5%) e uma de supermercados (2,8%) apresentaram presença de *Salmonella* spp., demonstrando que esses produtos estavam impróprios para o consumo. Constatou-se que dos 35 estabelecimentos analisados, 4 (11,4%) apresentaram *Salmonella* sp.

### **5.1.6. Estafilococos coagulase positiva**

A presença de estafilococos coagulase positiva em um alimento representa um risco à saúde pública, pois, geralmente, são produtores de toxinas e se estas forem ingeridas, causarão intoxicação alimentar. Essas enterotoxinas são resistentes ao calor e a ação das enzimas intestinais (BROOKS et al., 2012), o que é de grande importância na indústria de alimentos, já que o aquecimento não garante a

inativação da toxina previamente formada, mesmo que elimine a célula vegetativa, que, por sua vez, é sensível ao calor.

A análise de *Staphylococcus* spp, bem como o teste de coagulase, foram realizadas nos tempos 0 e 45 dias de armazenamento, sendo os valores médios encontrados apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados médios da contagem de estafilococos spp\*. (Log UFC/g) das amostras de hambúrgueres nos tempos 0 e 45 dias de armazenamento

Tratamentos	Tempos	
	0	45
1	3,9	4,0
2	3,9	6,4
3	6,2	7,7

\*Não foram encontrados estafilococos coagulase positiva em nenhum dos tratamentos

Não foram encontrados estafilococos coagulase positiva em nenhum dos tratamentos, entretanto observou-se aumento no número de *Staphylococcus* spp. nos tratamentos 2 e 3 até 45 dias de armazenamento. Para o tratamento 1, o número permaneceu praticamente inalterado, demonstrando a importância do congelamento para a manutenção da qualidade microbiológica inicial dos produtos durante o armazenamento.

O aumento no número de estafilococos coagulase negativa no tratamento 3 demonstra o desenvolvimento da cultura inicial adicionada à estes tratamentos, a qual é composta por *S. xylosus*.

Todos os tratamentos estão de acordo com o estabelecido pela RDC 12 de 02/01/01 (BRASIL, 2001), que preconiza número máximo de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g para estafilococos coagulase positiva em hambúrgueres.

## 5.2. Avaliações físico químicas e tecnológicas

Na Tabela 9 encontra-se o resumo da análise de variância das médias dos valores de cor (L, a, b), pH, atividade de água, percentual de encolhimento, percentual de rendimento nos tempos 0 e após 15, 30 e 45 dias de armazenamento.

Tabela 9 - Resumo da análise de variância dos valores de cor (L, a, b,), pH, Atividade de água (Aw), % de encolhimento (Enc) e % de rendimento (Rend)

FV	GL	Quadrado Médio						
		L	A	b	pH	Aw	Enc	Rend
Trat	2	25,9627**	0,1701 <sup>ns</sup>	0,1200 <sup>ns</sup>	0,0118 <sup>ns</sup>	0.0000 <sup>ns</sup>	10.438 <sup>ns</sup>	8,8074 <sup>ns</sup>
Dias	3	9,4420**	106,2698**	68,5695**	0,6546**	0.0007**	46,9520**	181,3360**
Trat x D	6	2,6073**	0,1355 <sup>ns</sup>	2,3424 <sup>ns</sup>	0,1083**	0.0000 <sup>ns</sup>	1,6664 <sup>ns</sup>	4,1557 <sup>ns</sup>
Erro	24	0,52047	4,0480	0,9670	0,0119	0.0001	2,4006	8,7390

\*\*F significativo a 1% de probabilidade (P<0,01);

<sup>ns</sup> F não significativo a 1 ou 5% de probabilidade

### 5.2.1. Parâmetros de Cor

A análise de variância dos resultados (Tabela 9) indicou, para os valores de L\*, interação significativa para os tratamentos e dias de armazenamento (P<0,01) e efeito significativo (P<0,01) de tratamento e dias de armazenamento.

O Teste de Tukey (Tabela 10) mostrou diferença significativa (P<0,01) entre os tratamentos após 15 dias de armazenamento. Os hambúrgueres que permaneceram congelados (Tratamento 1) apresentaram maior luminosidade durante o período analisado e os valores médios não variaram em função do período de armazenamento.

**Tabela 10.** Resultados médios do parâmetro L\* da análise de cor das amostras de hambúrgueres ao longo do tempo.

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
1	41,27Aa	40,53Aa	41,34Aa	40,31Aa
2	40,54Aa	38,30Bb	36,30Bc	36,67Bc
3	40,40Aa	38,89Bab	38,56Cb	38,30Cb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,01)

Os produtos que sofreram abuso de temperatura e foram adicionados de cultura iniciadora (Tratamento 3) diferiram (P<0,01) dos produtos mantidos sob as mesmas condições, porém sem adição de cultura (Tratamento 2), após 30 dias de armazenamento, apresentando maior luminosidade. Os hambúrgueres obtidos pelo

tratamento 2 apresentaram maior escurecimento ao longo do período de armazenamento.

Esta diferença na coloração entre os produtos que sofreram descongelamento provavelmente deve-se à oxidação da mioglobina e formação da metamioglobina, que possui coloração mais escura.

KOMIYAMA et al (2009), estudaram a coloração de hambúrgueres ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) elaborados com carne de frango pálida e normal e não encontraram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para todos os períodos avaliados, exceto para o valor de  $L^*$  analisado com 120 dias de estocagem, em que foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os hambúrgueres elaborados com carne de frango pálida, que apresentaram maior valor de  $L^*$  (64,83), e os elaborados com carne normal (61,32).

Os valores de  $L^*$  encontrados no presente trabalho estão abaixo dos encontrados por Novelo e Pollonio (2014), que verificaram valores variando entre 57,01 (tempo 0) a 56,94 (após 90 dias), entretanto são semelhantes aos encontrados por Comi et al. (2013), que verificaram valor de 43,2 para  $L^*$  analisando hambúrgueres adicionados de culturas bioprotetoras. Estes autores também não encontraram valores significativamente diferentes ao longo de 12 dias de armazenamento congelado.

Para o parâmetro  $a^*$  a análise de variância dos resultados (Tabela 9) não indicou interação significativa ( $P > 0,01$ ) nem efeito de tratamentos ( $P > 0,01$ ), mas indicou efeito significativo ( $P < 0,01$ ) de dias de armazenamento.

O teste de Tukey (Tabela 11) mostrou diferença significativa entre os valores de  $a^*$ , independente do tratamento aplicado, a partir de 15 dias de armazenamento, com redução do valor ao longo do período analisado.

**Tabela 11.** Resultados médios do parâmetro  $a^*$  da análise de cor das amostras de hambúrgueres ao longo do tempo.

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
Média	15,33A	9,30B	8,51B	7,86B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,01$ ).

A redução nos valores de  $a^*$  demonstra uma perda da coloração vermelha, durante o período de armazenamento, independente do tratamento empregado. Os valores encontrados são semelhantes aos verificados por Comi et al. (2013).

Para o parâmetro  $b^*$  a análise de variância dos resultados (Tabela 9) não indicou interação significativa ( $P>0,01$ ) nem efeito de tratamentos ( $P>0,01$ ), mas indicou efeito significativo ( $P<0,01$ ) do tempo de armazenamento.

O teste de Tukey (Tabela 12) mostrou diferença significativa entre os valores de  $b^*$ , independente do tratamento aplicado, a partir de 15 dias de armazenamento, com redução do valor ao longo do período analisado.

**Tabela 12.** Resultados médios do parâmetro  $b^*$  da análise de cor das amostras de hambúrgueres ao longo do tempo.

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
<b>Média</b>	16,29A	10,75B	11,11B	10,52B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,01$ )

A redução nos valores de  $b^*$  demonstra uma perda da coloração amarela, durante o período de armazenamento, independente do tratamento empregado.

Os parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  encontrados no presente trabalho, demonstram uma tendência dos produtos, ao escurecimento ao longo do período de estocagem.

### 5.2.2. Evolução do pH

A análise de variância dos resultados (Tabela 9) indicou, para os valores de pH, interação significativa entre os tratamentos e dias de armazenamento ( $P<0,01$ ) e efeito significativo ( $P<0,01$ ) de dias de armazenamento.

O teste de Tukey (Tabela 13) mostrou diferença ( $P<0,01$ ) entre o tratamento 1 (congelado) em relação aos demais tratamentos, após 30 dias de armazenamento. Não foi verificada diferença significativa ( $P>0,01$ ) entre os tratamentos 2 e 3 ao longo do período avaliado.

**Tabela 13.** Resultados médios de pH das amostras de hambúrgueres ao longo do tempo

Tratamento	Tempo (dias) pH			
	0	15	30	45
1	6,56Aa	6,47Aa	6,66Aa	6,68Aa
2	6,58Aa	6,34Aa	6,43Ba	7,26Bb
3	6,58Aa	6,37Aa	6,47ABa	7,10Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,01$ ).

Os produtos submetidos ao abuso de temperatura (Tratamentos 2 e 3) apresentaram maiores valores de pH após 45 dias de armazenamento. Esta elevação de pH deve-se provavelmente ao maior desenvolvimento microbiano verificado nestes produtos, com possível ação proteolítica e formação de compostos derivados de amônio.

Em estudos realizados por Wang et al. (2013) e Milani et al. (2003), foi verificado redução de pH nos produtos elaborados com cultura bioprotetora, entretanto os produtos foram mantidos sob refrigeração durante todo o período de armazenamento, o que possibilitou maior desenvolvimentos dos microrganismos presentes nos cultivos e, conseqüentemente, maior redução do pH.

### 5.2.3. Atividade de Água (AW)

A análise de variância dos resultados (Tabela 9) indicou interação significativa para os tratamentos e dias de armazenamento ( $P<0,01$ ) e efeito não significativo ( $P>0,01$ ) de tratamento e dias de armazenamento para o parâmetro Aw.

Independente do tratamento empregado, os valores de Aw dos hambúrgueres reduziram ao longo do armazenamento, apresentando diferença significativa ( $P<0,01$ ) pelo teste de Tukey, após 15 dias de armazenamento, conforme apresentado na Tabela 14.

**Tabela 14.** Resultados médios de atividade de água (aw) das amostras de hambúrgueres ao longo do tempo

Tratamento	Tempo (dias)
------------	--------------

	0	15	30	45
<b>Médias</b>	0,9422A	0,9322AB	0,9233B	0,9233B

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,01$ ).

A atividade de água é um dos fatores intrínsecos que mais afetam o desenvolvimento de microrganismos, sua redução contribui diretamente para que ocorra maior controle da população microbiana, bem como reduzindo a velocidade de reações indesejáveis, proporcionando, assim, um maior tempo de armazenamento do produto elaborado (AZEVEDO, 2008).

Durante o congelamento lento, os cristais de gelo crescem nos espaços intercelulares, deformando e rompendo as paredes celulares adjacentes. Esses cristais têm uma pressão de vapor menor que aquela existente no interior das células e, assim, a água migra da célula para o cristal em crescimento. As células sofrem desidratação e são danificadas, permanentemente, pelo aumento da concentração de solutos (FELLOWS, 2006), o que provavelmente contribuiu para a redução da atividade de água nos produtos.

Durante o armazenamento sob congelamento, as serpentinas de refrigeração removem umidade do ar. Ocorre, então, transferência de umidade do alimento para a atmosfera de estocagem, produzindo alterações superficiais no alimento, conhecidas como queima pelo frio. As áreas alteradas apresentam coloração mais clara, em decorrência das cavidades microscópicas, previamente ocupadas por cristais de gelo, os quais alteram o comprimento de onda da luz refletida. A queima pelo frio é um problema em alimentos de alta razão entre área superficial e volume, podendo ser minimizada com o uso de embalagens que apresentem boa barreira à umidade (BRITO e AZEREDO, 2012).

Ferreira et al. (2012) estudaram as características físico-químicas e sensoriais de hambúrgueres de carne bovina elaborados com cloreto de sódio, polifosfato e transglutaminase e obtiveram, para o tratamento controle (hambúrguer sem adição desses ingredientes), atividade de água igual a 0,90.

#### 5.2.4. Encolhimento

A análise de variância dos resultados (Tabela 9) indicou interação não significativa entre os tratamentos e dias de armazenamento ( $P>0,01$ ), efeito não significativo ( $P>0,01$ ) de tratamento e efeito de dias de armazenamento ( $P<0,01$ ) para o parâmetro encolhimento.

Independente do tratamento empregado, o percentual de encolhimento dos hambúrgueres ( $P<0,01$ ) aumentou com o decorrer do período de armazenamento de acordo com a tabela 15, apresentando efeito significativo ( $P<0,01$ ) pelo teste de Tukey, a partir de 30 dias de armazenamento.

**Tabela 15.** Resultados médios de Porcentagem de encolhimento das amostras de hambúrgueres ao longo do tempo.

Tratamento	Tempo (dias) Encolhimento			
	0	15	30	45
Médias	16,7589A	17,9500AB	19,2589B	22,0755C

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P>0,05$ ).

Bastos (2009) encontrou valor de encolhimento de 19,48% em hambúrgueres de carne suína. Borba (2010), comparando diferentes formas de preparo dos produtos, encontrou maior porcentagem de encolhimento em hambúrgueres de frango no tratamento submetido à cocção no microondas (16%), seguido do assado (6,66%) e frito (5,4%). Os hambúrgueres bovinos apresentaram maior tendência ao encolhimento, principalmente quando submetido a cocção por microondas (22,8%), seguido do assado (16,87%) e frito (12,88%). Amostras de hambúrgueres carne caprina apresentaram 25,19% de encolhimento (ALMEIDA, 2011), valor superior ao encontrado no presente estudo, mesmo após 45 dias de armazenamento.

#### 5.2.5 Rendimento

A análise de variância dos resultados (Tabela 16) não indicou interação significativa entre os tratamentos e dias de armazenamento ( $P>0,01$ ), nem efeito significativo ( $P>0,01$ ) de tratamento. Entretanto, verificou-se efeito de dias de armazenamento ( $P<0,01$ ) para o parâmetro rendimento.

Independente do tratamento empregado, o percentual de rendimento dos hambúrgueres ( $P < 0,01$ ) reduziu com o decorrer do período de armazenamento, apresentando efeito significativo ( $P < 0,01$ ) pelo teste de Tukey, a partir de 30 dias de armazenamento (Tabela 16).

**Tabela 16.** Resultados médios de Rendimento de cocção das amostras de hambúrgueres ao longo do tempo.

Tratamento	Tempo (dias)			
	0	15	30	45
<b>Médias</b>	73,1411A	72,0311A	67,3566B	63,3955C

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Marques (2007), na elaboração de um produto de carne bovina “tipo hambúrguer” adicionado de farinha de aveia, encontrou na formulação elaborada apenas com carne bovina rendimento de 67,58%. As formulações adicionadas de farinha de aveia apresentaram os maiores rendimentos, o que sugere que a farinha de aveia contribuiu para a retenção de água e aumento do rendimento do produto.

Bastos (2009) encontrou 74,10% de rendimento de hambúrgueres suínos. Borba (2010) verificou que o processo de cocção na elaboração de hambúrgueres pode afetar o rendimento. Neste sentido, os autores encontraram maior porcentagem de rendimento em hambúrgueres bovinos no tratamento submetido à cocção por fritura (79,96%), seguido do assado (75,94%) e por micro-ondas (73,5%).

Percentual de rendimento de 73,96% foi verificado por Almeida (2011) em amostras de hambúrgueres de carne caprina.

## 6. CONCLUSÃO

O hambúrguer tem como principal método de conservação o emprego de baixas temperaturas como refrigeração e congelamento. Entretanto a variação da temperatura durante a distribuição e o armazenamento destes produtos, favorece o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

Constatou-se que a utilização de culturas bioprotetoras em hambúrgueres se mostrou eficiente, uma vez que essa cultura conseguiu se desenvolver na matriz do produto e contribui para a manutenção da sua qualidade, quando submetidos a

abuso de temperatura, pois eles não se diferenciaram significativamente dos hambúrgueres que permaneceram sob temperatura de congelamento.

A importância da utilização dessas culturas bioprotetoras também se faz necessária para inibição de microrganismos deteriorantes, que podem interferir na qualidade nutricional e físico química do produto.

Não foi verificada nenhuma diferença quanto as características tecnológicas do produto adicionado de cultura bioprotetora o que é de grande importância, pois os consumidores estão acostumados a consumir o hambúrguer tradicional, e a alteração dessas características poderia levar a não aceitação do mesmo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. C.; SOUZA, R. M.; PINHO, L.; SOBRINHO, E. M.; SILVA, B. C. M.; Determinação de Perigos Microbiológicos em Carnes Bovinas Resfriadas Provenientes de Abates Clandestinos e Comércio Ilegal. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 4, p. 278-285, 2010.

ALMEIDA, M. A. **Microrganismos bioprotetores em salames com baixo teor de sal e seus efeitos sobre a qualidade global e sensorial**. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)- Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

ALMEIDA, R. S.; **Processamento de Hambúrguer de Carne Caprina Adicionados com Diferentes Níveis de Farinha de Aveia**. 2011. 73 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga, 2011.

ANDRITSOS, N. D.; Mataragas, M.; Mavrou, E.; Stamatiou, A.; Drosinos, E. H.; The microbial condition of minced pork prepared a retail stores in Athens, Greece. **Meat Science**, v. 91, p. 486-489, 2012.

AZEVEDO, P. R. A. de.; O valor nutricional da carne. **Revista Nacional da Carne**, n. 372, p.18-29, 2008.

BARBOSA, L.; MADI, L.; TOLEDO, M. A.; REGO, R. A.; As Tendências da Alimentação. **Brasil Food Trends**, p. 43, ago. 2010. Disponível em: < [http://www.brasilfoodtrends.com.br/Brasil\\_Food\\_Trends/index.html](http://www.brasilfoodtrends.com.br/Brasil_Food_Trends/index.html) >. Acesso em: 12 de outubro de 2016.

BASTOS, M. A. R. **Elaboração de hambúrguer de carne suína utilizando substitutos de gordura**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Centro Universitário de Belo Horizonte, Belo Horizonte, 2009.

BAYLEY, S.; RICHARDSON, L. J.; COX, N. A.; COSBY, D.E. Salmonella. In: JUNEJA, V.K.; SOFOS, J.N. **Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions**. Cap. 7, p. 108-118, Washington, DC: ASM Press, 2010.

BERNARDI, S.; GOLONELI, B. B.; Aspectos da Aplicação de Culturas *Starter* na Produção de Embutidos Cárneos Fermentados. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 133-140, 2010.

BERRY, B.W. Low fat level effectson sensry, shear, cooking and chemical properties of ground beef patties. **Journal of Food Science**, n.57, p537-540, 1992.

BOMDESPACHO, L. Q.; **Desenvolvimento de um Produto Tipo “Hambúrguer” à Base de Carne de Frango (*Gallus gallus*) e Resíduo de Soja, Fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014**. 2010. 104 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

BORBA, C. M.; OLIVEIRA, V. R.; MONTENEGRO, K. R.; HERTZ, P. F.; VENZKE, J. G.; Avaliação físico-química de hambúrguer de carne bovina e de frango submetidos a diferentes processamentos térmicos. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food Nutrition**, Araraquara, v. 24, n. 1, p. 21-27, jan./mar. 2013.

BORCH, E.; KANT-MUERMANS, M.L.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 103-120, 1996.

BRASIL. Frezeres de Supermercado II. INMETRO Instituto Nacional de Meteorologia, Qualidade e Tecnologia. 2005. Disponível em: < <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/freezeres.asp> > Acesso em: 10 de novembro de 2016.

BRASIL. **Instrução Normativa nº62 de 26 de agosto de 2003.** Métodos Analíticos Oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000.** Brasília, DF. 2000. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1683>.> Acesso em 12 de outubro de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária–ANVISA. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

BRASIL. **Produção de Carne no Brasil Aumenta 45% em 15 anos.** Ministério da Agricultura. 2016. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2016/04/producao-de-carne-no-brasil-aumenta-45porcento-em-15-anos> >. Acesso em: 12 de outubro de 2016.

BRITO, E. S.; AZEREDO, H. M. C.; **Fundamentos de estabilidade de alimentos.** 2 ed, Brasília, p. 326, 2012.

BROOKS, J. C. MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v. 31, p. 154 – 158, 2012.

CÁRCEL, J. A.; BENEDITO, J.; CAMBERO, M. I.; CABEZA; M. C.; ORDÓÑEZ, J. A.; Modeling and Optimization of the E-beamtreatment of Chicken Steaks and Hamburgers, Considering Food Safety, Shelf-life, and Sensory Quality. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 133-144, 2015.

CASABURI, A.; DI MONACO, R.; CAVELLAS, S.; TOLDRÁ, F.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional

fermented sausage ripening and sensory traits. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 335-347, 2008.

CASARIN, L. S.; **Sobrevivência de Escherichia Coli, Staphylococcus aureus e Salmonella enteritidis Durante o Armazenamento do Hambúrguer de Frango Congelado**. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em microbiologia de alimentos) Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COMI, G.; TIRLONI, E.; ANDYANTO, D.; MANZANO, M.; IACUMIN, L.; Use of Bio-protective Cultures to Improve the shelf-life and the Sensorial Characteristics of Commercial Hamburgers. **Food Science and Technology**, v. 62, p.1198-1202, 2015.

COSTA, L. O. **Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino(HBV)** . 2004. 127 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos). Universidade Católica De Goiás, Goiânia, 2004.

COSTA, L.O. **Processamento e Diminuição do Reprocesso do Hambúrguer Bovino (HBV)**. 2004. 127 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2004.

DORTA, C.; KADOTA, J. C. P.; NAKAMATSU, M. S. I.; Qualidade Microbiológica de Carnes Bovinas Embaladas a Vácuo e das Vendidas a Granel. **Revista Analytica**, n. 74, p. 58-73, 2015.

DUCATTI, R.; **Análises Microbiológicas e Quantificação de Proteína de Soja Pela Metodologia Isotópica (13c e 15n) em Hambúrgueres Bovinos de Marcas Comerciais Brasileiras**. 2014. 77 f. Dissertação (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e prática**. 2 ed, Porto Alegre, Artmed, 2006, 602 p.

FERREIRA, E. M. **Investigação da temperatura de comercialização e qualidade microbiológica de carnes e derivados adquiridos em supermercados de Arquimedes-RO**. Trabalho de conclusão de curso. Graduação de Engenharia em Alimentos. Departamento de Engenharia de Alimentos – Curso de Engenharia de Alimentos. RONDÔNIA – Brasil – 2014.

FERREIRA, M. S.; MÁRSICO, E. T.; MEDEIROS, R. J.; POMBO, C. R.; FREITAS, M. Q.; CLEMENTE, S. C. S.; JUNIOR, C. A. C. Comparação das características físico-químicas e sensoriais de hambúrgueres de carne bovina elaborados com cloreto de sódio, polifosfato e transglutaminase. **Rev. Bras. Med. Vet.**, n.34, v.1, p. 52-60, 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos** - 2ª Ed. Editora ARTMED, 2013, 607p.

FORTUNA, J. L.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M.; Influência da Temperatura de Armazenamento Sobre a Qualidade Microbiológica de Hambúrgueres Crus Comercializados em Niterói-RJ. **Scientia Plena**, v. 10, n. 5, 2014. FORTUNA, J. L.; **Pesquisa de Salmonella spp. Em Hambúrguer Cru Utilizando a Metodologia Microbiológica Convencional, o Método Salmosyst e o Método de Reação em Cadeia da Polimerase**. 2013. 228 f. Tese (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

FRANCO, D. G. M.; LANDGRAF, M.; **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, 2008.

FUNG D. Y. C., KASTNER C. L., HUNT M. C., DIKEMAN M. E., KROPF, D. Mesophilic and psychrotrophic bacteria population on hot-boned and conventionally processed beef. **Journal Food Protect**.43(7):547-550,1980.

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R.; **Ciência e Qualidade da Carne - Série Didática - Fundamentos**. Viçosa: Editora UFV. 2013. 197p.

HOLLEY, R.A.; GILL, C.O. Usos da embalagem em atmosfera modificada para carnes e produtos cárneos. Palestra. **III Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes**, 27 a 29 de setembro, 2005.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Tradução Eduardo Cesar Tondo et al. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KOMIYAMA, C. M.; MENDES, A. A.; TAKAHASHI, S. E.; MOREIRA, J.; BORBA, H. B. A.; LEONEL, F. R.; ROÇA, R. de O.; ALMEIDA, I. C. L. P.; NETO, A. B. Características qualitativas de produtos elaborados com carne de frango pálida e normal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 38-45, jan.-mar, 2009.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v.56, p. 105-115, 2000.

MARQUES, J.M. **Elaboração de um produto de carne bovina “tipo hambúrguer” adicionado de farinha de aveia**. 2007. 55 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MARTINS W.F; Rodrigues, M.S.A.; Pereira, K.D.; Deodato, J.N.V. Carnes de hambúrguer: avaliação higiênico-sanitária do ponto de vista microbiológico. Universidade Federal de Campina Grande. Disponível em:<<http://www.sovergs.com.br/site/higienistas/trabalhos/10060.pdf>>. acesso: 05 de dezembro de 2016.

MELO, L. F.; VILELA, N. A.; CARVALHO, P. L. N.; VEIGA, S. M. O. M.; NASCIMENTO, L. C.; Qualidade higiênico - sanitária da carne de hambúrguer Industrializada. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 2, p. 370-375, 2012.

MENEZES, A. C.; ALEXANDRINO, A. M.; Análise Microbiológica de Hambúrgueres Comercializados em Embalagens Primárias e Secundárias. **SaBios: Revista saúde e Biologia**, v. 9, p. 94-100, 2014.

MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M.; PAZ, P. B.; BELLE, M.; TERRA, N. N.; Bioproteção de Linguiça de Frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23 (2): p.161-166, maio-ago, 2003.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R.; Avaliação sensorial e da cor objetiva de hambúrgueres congelados formulados com linhaça dourada e derivados. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n. 4, p. 331, 2014.

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

OLIVEIRA, D. F.; COELHO, A. R.; BURGARDT, V. C. F.; HASHIMOTO, E. H.; LUNKES, A. M.; MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Alternativas para um Produto Carneio mais Saudável: Uma Revisão. **Brazil Journal Food Technoly**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 163-174, jul./set. 2013.

POTHAKOSA, V.; DEVLIEGHEREA, F.; VILLANIB, F.; BJÖRKROTHC, J.; ERCOLINIB, D.; Lactic Acid Bacteria and their Controversial Role in resh Meat poilage. **Meat Science**, v.109, p. 66-74, 2015.

RIBEIRO, C.B.A. Isolamento, seleção e aplicação de cultivos iniciadores para melhoramento da qualidade da linguiça “Tipo Toscana” não defumada. Dissertação Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, UFP, Curitiba, 2006.

RICHTER, R.L.; VEDAMUTHU, E.R. Milk and milk products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 483-496, 2001.

SÁ, E. Conservação do pescado. **Revista Aquicultura & Pesca**, Ano I, n.1, p.20-26, 2004.

SALES, B. W.; TUNALA, J. F.; VASCO, J. F. M.; RAVAZZANI, E. D. A.; CAVEIÃO, C.; Ocorrência de Coliformes Totais e Termotolerantes em pastéis fritos vendidos em bares no centro de Curitiba-PR. **Demetra: alimentação, nutrição & saúde**. v. 10, p. 77-78, 2015.

SALES, W. B.; KUCHAK, K. C.; CAVEIÃO, C.; Determinação de coliformes totais e termotolerantes em hambúrgueres vendidos em *fast foods* na cidade de Curitiba – Paraná. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 14, n. 2, p. 412-420, ago./dez. 2016.

SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W.H.; Lactic Acid Bacteria. **Food Spoilage Microorganisms**. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, p. 213–286, 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Doenças Transmitidas por Alimentos: Aspectos epidemiológicos 1999-2010**. Disponível em : <[http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31760](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31760)>. Acesso em: 27 de novembro de 2016.

SILVA, R.R. da. **Agronegócio Brasileiro da Carne Caprina e Ovina**. Itabuna: Agora, 2002. 111 p.

SILVESTRE, M. K. S.; ABRANTES, M. R.; PAIVA, W. S.; SOUZA E. S.; SILVA, J. B. A. Avaliação da qualidade da carne bovina in natura comercializada no município de Alexandria – RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.4, p. 327-331, 2013.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na Fabricação de Salame**. São Paulo: Varela, 2004.

Vasilopoulos, C.; De Maere, H.; De Mey, E.; Paelinck, H.; De Vuyst, L.; Leroy, F.; Technology-induced Selection Towards the Spoilage Microbiota of Artisan-type Cooked ham Packed Under Modified Atmosphere. **Food Microbiology**, v. 27, p. 77–84, 2010.

VELHO, A. L. M. C. S.; ABRANTES, M. R.; MEDEIROS, J. M. S.; AGUIAR, K. C. S.; SOUSA, E. S.; SOARES, K. M. P.; SILVA, J. B. A. Avaliação qualitativa da carne

bovina in natura comercializado em Mossoró-RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.9, n.3, p.212-217, 2015.

WANG, X. H.; REN, H. Y.; LIU, D. Y.; ZHU, W. Y.; WAG, W.; Effects of inoculating *Lactobacillus sakei* starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages. **Food Control**, v. 32, p. 591-596, 2013.