

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE MICRORGANISMO
PROBIÓTICO (*Bifidobacterium lactis*) APLICADO EM
PRODUTO CÁRNEO COZIDO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luiza Sawitzki Schossler

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE MICRORGANISMO
PROBIÓTICO (*Bifidobacterium lactis*) APLICADO EM
PRODUTO CÁRNEO COZIDO**

por

Luiza Sawitzki Schossler

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador: Prof^a. Leadir Lucy Martins Fries, PhD

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

A Comissão Examinadora, Abaixo Assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE MICRORGANISMO
PROBIÓTICO (*Bifidobacterium lactis*) APLICADO EM
PRODUTO CÁRNEO COZIDO**

elaborada por
Luiza Sawitzki Schossler

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Leadir Lucy Martins Fries, PhD
(Presidente/Orientador)

Maristela Cortez Sawitzki, Dr^a. (UNIPAMPA)

Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 20 de Março de 2009.

*Dedico este trabalho a minha mãe,
Sirlei Maria Sawitzki, uma
mulher batalhadora, incansável,
admirável pelo seu caráter,
persistência e honestidade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que guia os meus passos por diversos caminhos, muitas vezes considerados por mim intransponíveis, mas que estando presente em todos os momentos de minha vida concede-me força para vencer todos os obstáculos.

Ao Felipe Bohn Nedel, que tanto me faz feliz, pelo amor, carinho e paciência. Nos momentos difíceis soube, com sabedoria, me apoiar.

Aos meus queridos irmãos Leonardo e Luiz Antônio por me incentivarem e torcerem para que tudo desse certo sempre.

A minha querida tia Maria, que tanto me incentivou e apoiou durante a minha longa jornada de estudos.

Aos meus queridos primos Gláucia, Graziela e Emanuel que tantas vezes me acolheram durante as minhas viagens à Santa Maria.

As minhas queridas e grandes amigas Luciana de Abreu e Marlene Lovatto. Vocês são responsáveis por esta conquista, nossa amizade é um sentimento que o tempo nunca irá apagar. Obrigada pela paciência em me ajudar e pelas valiosas conversas.

A minha orientadora Professora Leadir Lucy Martins Fries, pela orientação, amizade e atenção dada nos momentos mais difíceis.

Ao meu co-orientador Prof. Ernesto Hashime Kubota pela dedicação e pelas horas incansáveis disponibilizadas durante a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador Prof Nelcindo Nascimento Terra pela disponibilidade em transmitir seus conhecimentos.

A Prof^a Neila Richards pela sua disponibilidade em me auxiliar na execução deste trabalho.

A Prof^a Luisa Helena Hecktheuer, pela atenção e orientação na elaboração da análise sensorial.

Ao Professor Volmir Antônio Polli e ao Dejanir do Colégio Politécnico da UFSM, pelos conhecimentos repassados e pelo valioso auxílio na elaboração e processamento do patê de presunto.

A Prof^a Janete Amador pela amizade e auxílio na realização da análise estatística.

A Liana Inês Guidolin Milani pela paciência, amizade e pelos ensinamentos transmitidos.

A Marialene Manfio, pelo apoio, pelos seus valiosos conselhos, palavras de incentivo e auxílio na realização das análises Físico-químicas.

A Bolsista Vanessa Sasso Padilha pela ajuda na realização deste trabalho.

A minha querida colega Ana Paula Rezer, pela amizade e pela ajuda na realização das análises.

Aos meus colegas Marlene Gomes Pereira, Vanessa Biasi, Thiffany Hautrive pela amizade, companhia e horas de conversas.

As minhas colegas de laboratório, Carline, Suelem, Marina, Monique, Ana Paula, Carlos, pela ajuda que me deram em todos os momentos.

Aos demais colegas, Professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

A Sacco[®] Brasil pelo fornecimento da cultura probiótica utilizada neste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela oportunidade de realizar este trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DA VIABILIDADE DE MICRORGANISMO PROBIÓTICO (*BIFIDOBACTERIUM ssp lactis*) APLICADO EM PRODUTO CÁRNEO COZIDO

AUTORA: LUIZA SAWITZKI SCHOSSLER
ORIENTADORA: LEADIR LUCY MARTINS FRIES
CO-ORIENTADORES: ERNESTO HASHIME KUBOTA
NELCINDO NASCIMENTO TERRA
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 20 de Março de 2009.

O presente projeto foi desenvolvido com o objetivo de elaborar um produto cárneo cozido, patê de presunto, com propriedades probióticas, a partir da inoculação do microrganismo probiótico *Bifidobacterium lactis* em concentração capaz de garantir a sua viabilidade no produto. O patê de presunto foi processado em dois diferentes tratamentos e um controle. Controle (C) – sem adição de microrganismo probiótico; tratamento 1 (T1) – com adição de microrganismo probiótico, *Bifidobacterium lactis*, em uma concentração final esperada no produto de 10^6 UFC. g^{-1} ; e, tratamento 2 (T2) – com adição de microrganismo probiótico *Bifidobacterium lactis*, em uma concentração final esperada no produto de 10^8 UFC. g^{-1} . Testes preliminares de sensibilidade da cultura ao cloreto de sódio (NaCl), e sal de cura (NaNO₂) foram realizados. As concentrações de NaCl adicionadas ao Agar MRS foram de 1,0%, 1,5% e 2,0%, e de NaNO₂ adicionada ao mesmo meio foram de 150, 200 e 250ppm. Testes com a combinação de NaCl e NaNO₂ também foram realizados para verificar o comportamento da linhagem frente à combinação destes dois sais, utilizando as mesmas concentrações, porém combinadas. Foi observado um crescimento expressivo das Bifidobactérias em todos os testes, o que ressaltou a sua resistência e possibilidade de utilização em produtos cárneos processados, que têm em suas formulações estes ingredientes. O produto desenvolvido foi avaliado através de análises físico-químicas (composição centesimal, pH e TBARS), microbiológicas (Coliformes a 45°C, *Clostridium perfringes*, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Salmonella* sp. e *Bifidobacterium lactis*) e sensoriais. Verificou-se através do resultado da análise da composição centesimal e do pH que o produto atendeu a todas as exigências estabelecidas pela legislação. As determinações de Oxidação Lipídica através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) mostraram que o tratamento controle apresentou uma evolução na oxidação lipídica superior aos outros tratamentos (T1 e T2), sugerindo que os microrganismos probióticos apresentaram uma influência na estabilidade do produto quanto à oxidação dos lipídios. A estimativa da população de *Bifidobacterium lactis* apresentou no T1 concentrações iniciais de $5,6 \times 10^6$ UFC. g^{-1} , a partir do 14º dia de armazenamento houve queda de um ciclo log. chegando ao 31º dia com uma população estimada de $4,3 \times 10^5$ UFC. g^{-1} ; o T2 apresentou concentração inicial de $8,4 \times 10^8$ UFC. g^{-1} , sofrendo uma queda de 1 ciclo logarítmico no 31º dia, terminando com uma concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC. g^{-1} . Portanto, pode-se constatar que o tratamento T1 apresentou viabilidade como alimento probiótico (contagem mínima de 10^6 UFC. g^{-1}), por 14 dias, enquanto que o tratamento T2 apresentou-se viável como probiótico durante todo o período de análises, ou seja, por 31 dias. A análise sensorial realizada demonstrou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) quanto à aceitação global dos tratamentos T1 e T2, tendo ambos uma boa aceitação quanto ao teste de intenção de compra do produto. Desta forma pode-se observar que existe a viabilidade de aplicação dos microrganismos probióticos em produtos cárneos cozidos como o patê de presunto e que este possui aceitação podendo servir como alternativa no desenvolvimento de produtos cárneos com propriedades funcionais.

Palavras-chave: alimentos funcionais; probióticos; *bifidobacterium lactis*; produto cárneo; patê de presunto.

ABSTRACT

Master Degree Dissertation
Graduate Program in Science and Food Technology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

STUDY OF AVAILABILITY OF PROBIOTIC MICROORGANISMS (*BIFIDOBACTERIUM LACTIS*) APPLIED IN COOKED MEAT PRODUCTS

Author: LUIZA SAWITZKI SCHOSSLER
Adviser: LEADIR LUCY MARTINS FRIES
Co-Adviser: ERNESTO HASHIME KUBOTA
NELCINDO NASCIMENTO TERRA

Place and Date to Defense: Santa Maria, March 20th, 2009.

This project was developed to prepare a cooked meat product, Ham Pate, with probiotic properties from the inoculation of the *Bifidobacterium lactis* probiotic organism in a concentration capable of ensuring its viability in the product. Ham pâté was processed in two different treatments and a control. Control (C) – without addition of probiotic microorganisms; treatment 1, (T1) – with the addition of probiotic microorganisms, *Bifidobacterium lactis*, in a final concentration expected in the product of 10^6 UFC. g^{-1} ; and, treatment 2 (T2) – with the addition of probiotic microorganisms, *Bifidobacterium lactis*, in a final concentration expected in the product of 10^8 UFC. g^{-1} . Preliminary tests of culture sensitivity to the sodium chloride (NaCl) and salt of curing ($NaNO_2$) were performed. The concentrations of (NaCl) added to MRS agar were 1.0%, 1.5% and 2.0%, and ($NaNO_2$) was added in 150, 200 and 250ppm. Tests with the combination of NaCl and ($NaNO_2$) were also performed to verify the front line to the combination of these two salts, using the same concentrations, but combined. It was observed a growth of *Bifidobacterium* in all tests, that showed its resistance and suitability for using it in processed meat products that have these ingredients in their formulations. The developed product was tested by physical-chemical analysis (proximate composition, pH and TBARS), microbiological (coliform at 45° C, *Clostridium perfringes*, *Staphylococcus* coagulase positive, *Salmonella* sp. and *Bifidobacterium lactis*) and sensory. It was observed through the result of proximate composition analysis and pH that the product met all the requirements established by legislation. The determination of lipid oxidation by determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) showed that the control treatment resulted in lipid oxidation evolution much higher than other treatments (T1 and T2), suggesting that the probiotic microorganisms had an influence on stability of the product on the oxidation of lipids. The number of *Bifidobacterium lactis* viable cells showed in T1 initial concentrations of 5.6×10^6 UFC. g^{-1} , in the 14th day of the analysis fell into a cycle log. reaching in the 31st day a counting of viable cells of 4.3×10^5 UFC.g-1, the T2 had initial concentration of 8.4×10^8 UFC.g⁻¹, suffering a dropping of 1 log cycle in the 31st day, ending with a concentration of 1.5×10^7 CFU. g^{-1} . So, it's possible to conclude that treatment T1 was viable as probiotic food (counting at least 10^6 UFC.g⁻¹), for 14 days, while the treatment T2 was viable as probiotic during the entire period of analysis, in other words, for 31 days. The sensory analysis showed that there was no significant difference ($p < 0.05$) for overall acceptance of treatments T1 and T2, both having a good acceptance on the test of the product purchase intention. Thus, it's possible to observe that there is a feasibility of probiotic microorganisms' application in cooked meat products, such as ham pâté, it has more acceptance and it can be served alternative to the development of meat products with functional properties.

Key words: functional food; probiotics; *Bifidobacterium lactis*; meat products; ham pâté.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Benefícios nutricionais de alimentos funcionais com microrganismos probióticos	19
Tabela 2 - Formulação Padrão de patê de presunto	31
Tabela 3 - População microbiana de <i>Bifidobacterium lactis</i> (Log UFC.g ⁻¹), submetida a diferentes concentrações de NaCl	42
Tabela 4 - População microbiana de <i>Bifidobacterium lactis</i> (Log UFC.g ⁻¹), submetida a diferentes concentrações de NaNO ₂	43
Tabela 5 - População microbiana de <i>Bifidobacterium lactis</i> (Log UFC.g ⁻¹), submetida a combinação de diferentes concentrações de NaCl e NaNO ₂	43
Tabela 6 - Composição Centesimal média do patê de presunto adicionado de microrganismo probiótico	44
Tabela 7 - Análises microbiológicas (log UFC.g ⁻¹) realizadas durante o período de armazenamento do patê de presunto inoculado com <i>Bifidobacterium lactis</i>	49
Tabela 8 - Estimativa da população de <i>Bifidobacterium lactis</i> durante período de armazenamento do patê de presunto (UFC.g ⁻¹)	50
Tabela 9 - Teste de aceitabilidade para amostras de Patê de Presunto adicionado de <i>Bifidobacterium lactis</i> quanto aos atributos de cor, aroma, sabor e textura	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma geral de processamento do Patê de Presunto adicionado de Microrganismo Probiótico.....	33
Figura 2 - Curvas de regressão ajustadas para o pH, conforme o modelo estimado, para cada tratamento	46
Figura 3 - Curvas de regressão ajustadas para TBARS, conforme o modelo estimado, para cada tratamento.....	47
Figura 4 - Gráfico com as médias de cada atributo conforme o tratamento.....	52
Figura 5 - Teste de Intenção de Compra – Comportamento dos Avaliadores frente ao Tratamento (T1)	53
Figura 6 - Teste de Intenção de Compra – Comportamento dos Avaliadores frente ao Tratamento (T2)	53

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Etapas de processamento do patê de presunto: adição da matéria-prima no <i>cutter</i> / trituração e emulsificação	67
APÊNDICE 2 – Etapas de processamento do patê de presunto: adição dos ingredientes / mistura da massa cárnea	68
APÊNDICE 3 – Etapas de processamento do patê de presunto: adição do corante a massa cárnea / inoculação de <i>Bifidobacterium lactis</i>.....	69
APÊNDICE 4 – Crescimento de microrganismo probiótico-<i>Bifidobacterium lactis</i> inoculado no patê de presunto nas temperaturas de 40, 50 e 60°C	70
APÊNDICE 5 – Ficha de Análise Sensorial para Teste de Aceitação e de Intenção de Compra	71
APÊNDICE 6 – Variável pH - análise de variância univariada em esquema de parcelas subdivididas no tempo	72
APÊNDICE 7 – Variável TBARS - análise de variância univariada em esquema de parcelas subdivididas no tempo	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Alimentos Funcionais	17
3.1.1 Probióticos	18
3.1.1.1 O Gênero <i>Bifidobacterium</i>	21
3.2 Derivados Cárneos Funcionais	22
3.3 Produtos Cárneos	23
3.3.1 Produto Carne Cozido – Patê de Presunto	23
3.3.1.1 Oxidação Lipídica em Patê	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Teste da sensibilidade da cultura probiótica frente à concentração de cloreto de sódio (NaCl) e nitrito de sódio (NaNO₂)	29
4.2 Elaboração de patê de presunto adicionado de microrganismo probiótico	30
4.2.1 Matéria-prima	30
4.2.2 Ingredientes	30
4.2.3 Processamento do Patê de Presunto	31
4.2.3.1 Cultura Probiótica	31
4.2.3.2 Preparo do Inóculo	31
4.2.3.3 Produção do Patê de Presunto	32
4.2.3.4 Descrição das etapas de produção	32
4.2.3.5 Inoculação dos microrganismos probióticos (<i>Bifidobacterium lactis</i>)	34
4.3 Avaliação dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais do patê de presunto adicionado de microrganismo probiótico durante o seu período de armazenamento	35
4.3.1 Amostras analisadas	35
4.3.2 Análises físico-químicas	35

4.3.2.1 Composição Centesimal do produto elaborado.....	35
4.3.2.2 Determinação do pH	36
4.3.2.3 Determinação da Oxidação Lipídica (TBARS).....	36
4.3.3 Análises Microbiológicas	37
4.3.3.1 Contagem de microrganismos deteriorantes	37
4.3.3.2 Contagem estimada da população de <i>Bifidobacterium</i> sp.	39
4.3.4 Análise Sensorial.....	39
4.3.4.1 Teste Afetivo de Aceitação	40
4.3.4.2 Teste de Intenção de Compra	40
4.3.5 Análise Estatística	41
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	42
5.1 Teste da sensibilidade da cultura probiótica frente à concentração de cloreto de sódio (NaCl) e sal de cura (NaNO₂)	42
5.2 Caracterização Físico-química do produto	43
5.2.1 Determinação da Composição Centesimal	43
5.2.2 Determinação de pH	44
5.2.3 Determinação da Oxidação Lipídica (TBARS)	46
5.3 Características microbiológicas do produto	48
5.3.1 Contagem de microrganismos contaminantes	48
5.3.2 Estimativa da população de <i>Bifidobacterium lactis</i>	49
5.4 Análise Sensorial	51
CONCLUSÃO	54
SUGESTÕES	56
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICES	66

1 INTRODUÇÃO

Há em todo o mundo um crescente interesse pelos alimentos que contêm componentes capazes de influenciar positivamente as atividades fisiológicas ou metabólicas. Neste contexto, destaca-se a crescente busca do setor alimentício em desenvolver produtos com tais características funcionais, buscando a promoção da saúde, além da função nutricional.

Para o setor cárneo, os alimentos funcionais constituem uma excelente oportunidade de diversificação da produção e posicionamento em um mercado emergente. A possibilidade de dispor de derivados cárneos funcionais passa por condicionar a presença de compostos que podem incrementar a proporção daqueles que exibem efeitos benéficos, ou limitar o conteúdo daqueles que possuem implicações negativas para a saúde (COLMENERO, 2005).

Os processos de elaboração dos produtos cárneos permitem atuar de várias formas para promover o efeito funcional. Alterações na composição dos ingredientes (cárneos e não cárneos) utilizados em sua elaboração se manifestam como uma oportunidade de modificar a composição dos derivados cárneos, e como consequência na presença de diversos compostos bioativos de caráter endógeno e exógeno (COLMENERO, 2005).

Carne e produtos cárneos são essenciais na dieta. Seus principais componentes, além da água, são as proteínas e gorduras, com uma substancial contribuição de vitaminas e minerais de alto grau de biodisponibilidade (GINÉS *et al.*, 2005). Considerando que o consumo de carne suína no País está em um patamar abaixo do esperado, a indústria cárnea possui grande interesse em agregar valor a esta matéria-prima, com o desenvolvimento de novos produtos, buscando atrair cada vez mais o consumidor.

A incorporação de microrganismos probióticos aos produtos cárneos, utilizando como matéria-prima a carne suína, surge como uma alternativa para elaboração destes derivados com propriedades comprovadamente funcionais. O gênero *Bifidobacterium* está comumente envolvido na produção de alimentos probióticos e de acordo com BARBOSA *et al.* (2001), apresenta comprovada prevenção ou tratamento de distúrbios intestinais infecciosos.

Considerando que os microrganismos probióticos aparecem no trato gastrointestinal do homem desde o seu nascimento, e que com o passar dos anos, devido a fatores como dieta, ambiente e *stress* a medicação, estas concentrações decrescem chegando a ser mínimas, ocorrendo o favorecimento do crescimento de bactérias patogênicas desequilibrando a flora intestinal (FULLER, 1994; HOOVER, 1993; CHR, 1997). De acordo com CHR HANSEN (1997); HUGHES *et al.* (1991) e TAHRI *et al.* (1997) quando se assegura que a população de microrganismos probióticos se conserve ou volte a atingir níveis significativos no intestino, o ser humano pode experimentar uma série de benefícios como o melhoramento da tolerância à lactose, redução de bactérias patogênicas, melhor resposta imune e redução do colesterol sanguíneo além de uma melhor resposta antitumoral.

Observando-se que a alimentação humana tem sofrido inúmeras modificações nos últimos anos devido a sua correlação cada vez maior com enfermidades de origem alimentar, verifica-se o interesse cada vez maior do consumidor pelos alimentos com propriedades funcionais. Desta forma a suplementação da alimentação com microrganismos comprovadamente probióticos como as culturas do gênero *Bifidobacterium lactis*, constituem-se como uma alternativa na elaboração de derivados cárneos com características funcionais.

No presente estudo, buscou-se o desenvolvimento de patê de presunto como alimento a ser adicionado de cultura probiótica, tal produto que de acordo com GONÇALVES *et al.* (1995) e MINOZZO *et al.*, (2004) apresenta-se como um dos produtos cárneos com consumo em ascensão nos últimos anos, sendo um produto cozido e com tradições gastronômicas importantes, apresentando características sensoriais bastante apreciadas. O patê de presunto, por ser um produto pronto, consumido sem prévio aquecimento, possibilita a presença de células viáveis de microrganismos do gênero *Bifidobacterium* uma vez que estes não suportam temperaturas de cozimento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a viabilidade da elaboração de produto cárneo cozido, patê de presunto, com propriedades probióticas a partir da inoculação de *Bifidobacterium lactis*.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Realizar a multiplicação dos microrganismos probióticos de modo a obter número viável para inoculação na formulação do Patê de Presunto;
- II. Testar da Sensibilidade da cultura probiótica frente à concentração de cloreto de sódio e sal de cura (nitrito de sódio) a ser utilizada na formulação do patê de presunto;
- III. Produção do patê de presunto com a inoculação de microrganismo probiótico;
- IV. Estimar a população de microrganismos probióticos de modo a acompanhar o seu respectivo desempenho no produto, determinando a sua funcionalidade como probiótico, durante o armazenamento por 31 dias sob refrigeração;
- V. Avaliar a qualidade microbiológica do produto através da determinação da população de coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutor e *Salmonella* sp.;
- VI. Determinar a composição centesimal do patê de presunto;
- VII. Analisar as características físico-químicas importantes na conservação do patê de presunto como, pH e determinação das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS);

VIII. Analisar sensorialmente o produto quanto ao seu grau de aceitabilidade e intenção de compra do produto, pelos consumidores, frente à adição de probiótico no patê de presunto.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimentos Funcionais

Os alimentos funcionais são comumente descritos como produtos que promovem adicionais benefícios à saúde além dos seus nutrientes básicos (TERATENAVAT & HOOKER, 2006).

Os consumidores estão cada vez mais atentos à relação alimento/saúde em consequência do *marketing* dos produtos alimentícios com propriedades promotoras à saúde, ou seja, dos alimentos funcionais (NUTRITION BUSINESS JOURNAL *apud* LEROY & DE VUYST, 2004). Neste contexto entende-se que a definição dos termos nutracêutico e alimento funcional deve ser considerada. A denominação nutracêutico refere-se aos compostos bioativos, enquanto que alimentos funcionais referem-se àqueles que possuem estes compostos bioativos e assim proporcionam benefícios à saúde (ANDLAUER & FÜRST, 2002).

O termo nutracêutico foi proposto em 1989 pela *Foundation for Innovation in Medicine* (Nova York, EUA), para definir uma das áreas biomédicas de rápido crescimento. Estes compostos possuem ação fisiológica específica, contribuindo para a saúde do consumidor. Seu apelo nutricional é referente à proteção efetiva no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e inflamatórias e melhoramento do sistema imunológico (ANDLAUER & FÜRST, 2002).

Os consumidores acreditam nos benefícios oferecidos por alimentos e por bebidas com características funcionais. Mais de 80% deles afirmam que, atualmente, consomem ou teriam interesse em consumir alimentos ou bebidas incrementados com tais benefícios. Ocasionalmente quando decidem sua compra, uma parcela significativa de consumidores menciona a saúde de um produto como fator decisivo para compra (INTERNATIONAL FOODS INFORMATION COUCIL, 2007).

Com a demanda crescente por “alimentos saudáveis”, a pesquisa e o desenvolvimento de novas categorias de produtos têm sido estimulados na indústria de alimentos de todo o mundo. Nos últimos anos, estes alimentos têm despertado o

interesse da comunidade científica e das indústrias de alimentos (SANDERS, 1998; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002; HALSTED, 2003).

Atualmente, o conceito que se tem sobre a microbiota intestinal dos seres humanos leva a acreditar que a mesma possui um papel fundamental na saúde, podendo ser controlada através de uma alimentação equilibrada e específica, pois ela exerce função considerável sobre reações bioquímicas importantes no ser humano. Quando em equilíbrio, a microbiota impede a ação de microrganismos potencialmente patogênicos, evitando que possam vir a causar doenças. Por outro lado, quando em desequilíbrio, a população de bactérias benéficas no trato intestinal diminui, bactérias potencialmente patogênicas encontram espaço para se multiplicar podendo causar sérios danos à saúde (ZIEMER & GIBSON, 1998).

Os probióticos são considerados alimentos funcionais, uma vez que ao serem adicionados a determinados alimentos e, por diferentes mecanismos, são eficazes na prevenção e no tratamento de algumas enfermidades como a diarreia causada por rotavirus, *Clostridium difficile* ou a induzida pelo consumo de antibióticos e as colites alérgicas (LORENTE & SERRA, 2001).

3.1.1 Probióticos

Os efeitos benéficos (hipocolesterolêmicos, anticancerígenos e ações antagônicas frente à patógenos entéricos) de alguns microrganismos presentes tradicionalmente nos processos fermentativos são de interesse da indústria cárnea. Assim, a inoculação de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, tratados em condições específicas são utilizadas para assegurar a atividade microbiana (COLMENERO, 2005).

Conforme Saavedra *et al.* (1994); Barbosa *et al.* (2001), diferentes preparações probióticas têm mostrado sucesso no tratamento e prevenção das infecções intestinais, incluindo salmoneloses, shigeloses, diarreia induzida por antibióticos e causada por *C. difficile*, bem como dos distúrbios associados ao aumento da permeabilidade intestinal ou falha nas funções das barreiras da mucosa. A tabela 1 apresenta alguns dos benefícios nutricionais de alimentos funcionais com bactérias probióticas.

Tabela 1 – Benefícios nutricionais de alimentos funcionais com microrganismos probióticos.

Efeitos benéficos	Possíveis causas e mecanismos
Melhora a digestibilidade Melhora o valor nutricional	- Quebra parcial de proteínas, gorduras e carboidratos. Eleva os níveis de vit.B e certos aa, como metionina, lisina e triptofano;
Melhora utilização da lactose	- Reduz a lactose no produto e disponibiliza a lactase.
Ação antagônica aos patogênicos entéricos	- Desordens, como diarreia, colites, úlceras, diverticulite e colites antibióticas controladas pela acidificação, inibidores micorbianos e prevenção da adesão patogênica;
Colonização no intestino	- Sobrevivência no ácido gástrico, resistência a lisozima e baixa tensão superficial do intestino, aderência à mucosa, multiplicação no trato intestinal, modulação do sistema imunológico;
Efeito anticarcinogênico	- Conversão pré-carcinógenos em compostos inofensivos; ação inibitória de alguns tipos de câncer, em particular os do trato gastrointestinal pela degradação de pré-carcinógenos, redução das enzimas promotoras do câncer e estímulo do sistema imune;
Efeito hipocolesterolêmico	- Produção de inibidores da síntese do colesterol. Uso do colesterol pela assimilação e precipitação com desconjugação de sais biliares;
Modulação Imunológica	- Interação na formação de macrófagos, estímulo da produção de células supressoras de γ -interferon.

GOMES & MALCATA (1999)

O potencial probiótico pode diferir até mesmo para diferentes linhagens de uma mesma espécie. Estas podem ter efeito imunológico específico e atuarem de formas distintas sobre a mucosa saudável ou inflamada (ISOLAURI *et al.*, 2004).

Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, as culturas devem ser empregadas com base na sua seleção e principalmente no seu desempenho tecnológico. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas no produto e ser estáveis e viáveis durante armazenamento. Essas culturas podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Alguns critérios considerados preferenciais para a seleção de bactérias probióticas, conforme Collins *et al.* (1998); Saarela *et al.* (2000) são: o gênero ao qual pertence, a bactéria ser de origem humana e apresentar estabilidade frente a

ácido e a bile; apresentar capacidade de adesão à mucosa intestinal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano; possuir capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino. Outros critérios fundamentais são: apresentar-se seguro para uso humano, apresentar histórico de não patogenicidade e não estarem associadas a outras doenças, tais como endocardite, além da ausência de genes resistentes a antibióticos.

A qualidade de um produto probiótico é geralmente determinada pelo nível, viabilidade e quantidade das células do probiótico no alimento. Isto tem sido proposto como a garantia dos efeitos benéficos a saúde humana (LAHTINEN *et al.*, 2005). De acordo com Saad (2006), alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos probióticos (10^7 UFC/g de produto), desta forma para serem de importância fisiológica ao consumidor, os probióticos devem alcançar populações acima de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL de bioproduto. A garantia de estímulo da multiplicação de Bifidobactérias no cólon pode ser assegurada com doses diárias de 4 a 5g de inulina e/ou oligofrutose (JELEN *et al.*, 1998; CHARTERIS *et al.*, 1998; NINESS, 1999; ROBERFROID, 1999).

Geralmente o requerido para a sobrevivência das bactérias probióticas ao trato gastrointestinal, de modo que atinjam a porção distal do intestino, é o de números aproximados de 10^7 células.g⁻¹ de alimento para se alcançar os seus efeitos benéficos (SAAD, 2006). A legislação que estabelece as normativas para leites fermentados, determina uma população de 10^6 células viáveis por grama de alimento de Bifidobactérias, para se garantir a funcionalidade do alimento como probiótico (BRASIL, 2000).

É importante definir o período de tempo no qual os microrganismos probióticos permanecem viáveis em quantidade necessária para exercer função benéfica ao organismo. Esta viabilidade no produto irá depender de fatores como, o processo ao qual o microrganismo foi submetido, a manipulação do alimento e o seu armazenamento. A possibilidade de se aplicar microrganismos probióticos, diretamente no produto, sem uma etapa prévia de fermentação, como a exigida por alguns alimentos, contribui para uma maior eficiência de processo, ao diminuir o tempo de produção dos alimentos e também de minimizar o requerimento de equipamentos especiais em algumas plantas de processamento, além de se

minimizar a interferência no sabor do produto desenvolvido (CORRALES *et al.* 2007).

3.1.1.1 O Gênero *Bifidobacterium*

De acordo com Barbosa *et al.* (2001), o gênero *Bifidobacterium* constitui o mais recente grupo de bactérias reconhecidas como adjuntos dietéticos.

Quanto as suas características são imóveis, Gram-positivas, não esporuladas, bastonete curvo, apresentando normalmente uma bifurcação em forma de Y (Holt, 1994; BARBOSA *et al.*, 2001). Bifidobactérias fermentam açúcares produzindo principalmente ácido acético e lático, não formando gás carbônico. Crescem a uma temperatura ótima de 37-41 °C, não crescendo a 45°C. O pH inicial ótimo é de 6-7, e, abaixo de 4,5 e acima de 8,5 não há crescimento, sendo destruídas a 60°C (LAROIA & MARTIN, 1990).

Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (SAAD, 2006).

São habitantes naturais do trato intestinal humano, representando 3-10% do microbiota do cólon em adultos e até 91% em bebês lactantes (SGHIR *et al.*, 2000), cuja proliferação é estimulada por componentes glicoprotéicos de κ -caseína no colostro humano. O número de bifidobactérias decresce com o aumento da idade e torna-se, dependendo do indivíduo e/ou de sua dieta, o terceiro gênero mais abundante após os *Bacteróides* e *Eubacterium*. O final da idade adulta e início da senilidade são caracterizados por significativa redução no número de bifidobactérias, enquanto bactérias contaminantes como clostrídios e coliformes tendem a aumentar, em geral, devido a diminuição da secreção de suco gástrico nesta faixa etária. Este perfil de idade pode ser influenciado pela ingestão diária de fatores bifidogênicos e pela fisiologia do hospedeiro (VINDEROLA *et al.*, 1999).

Há crescente evidência na contribuição deste grupo bacteriano para a manutenção de um estado saudável da microbiota intestinal. Isto conduziu à exploração difundida de algumas cepas como probióticas, principalmente na forma de produtos lácteos funcionais (OUWEHAND *et al.*, 2002). Estudos recentes

mostram que alimentos com altas concentrações de microrganismos do gênero *Bifidobacterium* comprovadamente probióticas, não apresentam nenhum risco de toxicidade ou de desenvolvimento de enfermidades de origem alimentar (MEILE *et al.* 2007).

Quanto a sua adição nos alimentos as bifidobactérias, ao contrário das culturas starters, não possuem significativa influência na acidificação do meio, e/ou na formação de textura e *flavor*, principalmente de leites fermentados; sendo aplicada quase que exclusivamente como promotora de saúde para o consumidor destes alimentos (LEAHY *et al.* 2005).

3.2 Derivados Cárneos Funcionais

A possibilidade de desenvolver produtos cárneos funcionais são muitas, e esta envolve a eliminação, incremento ou substituição de componentes com o objetivo de se obter produtos de consumo freqüente, saudável e funcional. Estes cárneos perseguem entre outros aspectos: melhora de crescimento e desenvolvimento, regulação dos processos metabólicos básicos, defesa contra o stress oxidativo, atuação sobre a fisiologia cardiovascular e gastrintestinal, o rendimento cognitivo e mental, e o rendimento e melhora do estado físico do ser humano (SANCHES-MUNIZ, 2005).

De acordo com Bortoluzzi (2008 apud TÁRRAGA, 2008, p.52), vários estudos estão sendo desenvolvidos seguindo o caminho dos produtos lácteos, tentando adaptá-los aos produtos cárneos, como, por exemplo, a utilização de fibras, colágeno, soja, microrganismos, fortificação com minerais, ácidos graxos, fitoquímicos, pré e probióticos, além do uso de antioxidantes naturais provenientes de extratos de óleos essenciais de plantas ou frutos.

Para pesquisadores do setor cárneo, acredita-se que no início as indústrias de alimentos do setor irão atuar em campos específicos buscando agregar valor aos seus produtos; mas, com a elevação do interesse do consumidor por estes produtos cárneos com alegação de propriedades funcionais, irá ocorrer um estímulo para produção em maior escala o que tornará o preço destes produtos mais acessíveis (JANUZZI, 2008 apud TÁRRAGA, 2008, p.52).

De acordo com Sanches-Muniz (2005) atualmente três correntes estão sendo trabalhadas pela indústria cárnea na busca pelo desenvolvimento dos produtos com propriedades funcionais sendo elas: atuação sobre o genoma, a alimentação do animal e sobre o processo de elaboração dos produtos cárneos.

3.3 Produtos Cárneos

De acordo com Terra (1998) a industrialização da carne consiste basicamente na sua transformação em produtos cárneos; sendo que um dos seus objetivos maiores é o aumento da sua vida útil, desenvolvendo diferentes sabores e utilizando partes da carcaça do animal que dificilmente seriam comercializadas em estado fresco. Por isso, a elaboração de produtos cárneos deve ser entendida hoje, como uma forma de se oferecer ao consumidor uma maior diversidade de alimentos com processos de transformação cada vez mais eficazes e capazes de elaborar produtos de alta qualidade e bastante diferenciados (ORDÓÑEZ, 2005).

Como definição, considera-se produtos e derivados cárneos, os produtos alimentícios preparados total ou parcialmente com carnes, miúdos ou gorduras, e subprodutos comestíveis procedentes de animais de abate ou outras espécies e podendo se agregar eventualmente ingredientes de origem vegetal, além de condimentos, especiarias e aditivos autorizados (ORDÓÑEZ, 2005).

O que caracterizou e particularizou o desenvolvimento de produtos cárneos, foram as necessidades de cada zona geográfica, onde costumes e condições climáticas atuaram diretamente na diferenciação destes produtos que hoje são extensamente fabricados e alvos de pesquisas do setor cárneo.

3.3.1 Produto Cárneo Cozido – Patê de Presunto

Patê é definido como o produto cárneo industrializado obtido a partir de carnes e/ou produtos cárneos e/ou miúdos comestíveis, das diferentes espécies de animais comercializados e transformados em pasta, adicionados de ingredientes e

submetidos a um processo térmico adequado (BRASIL, 2000). De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos – ABIA (1997), o patê vem ganhando aceitação no mercado consumidor, principalmente nos estados do Sul e Sudeste, sendo os tipos mais consumidos o de presunto e galinha.

O patê de presunto é um produto industrializado que contém ingredientes, como carnes, gorduras e especiarias, bem trituradas até se obter uma massa fina, sendo facultativa a presença de pedaços de presunto (SCHMELZER - NAGEL, 1999). Considerado um produto cárneo emulsionado, como salsichas e mortadelas, é bastante popular, sendo largamente consumido em um mercado que exige cada vez mais rapidez e praticidade (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2006).

Conforme sua estrutura básica, uma emulsão cárnea pode ser considerada uma mistura na qual os constituintes da carne são finamente divididos e dispersam-se de forma semelhante a uma emulsão de gordura em água; sendo a fase descontínua a gordura, e a fase contínua uma solução aquosa de sais e proteínas insolúveis em suspensão, contendo ainda porções de fibras musculares ainda dentro do sarcolema e restos de tecido conjuntivo (ORDÓÑEZ, 2005).

Os principais agentes emulsificantes são as proteínas cárneas solúveis em soluções salinas, sendo constituídas principalmente pelas proteínas miofibrilares. A eficácia emulsificante das proteínas e também a estabilidade da emulsão cárnea, depende tanto do pH da carne como da quantidade de sal empregada na formulação (ORDÓÑEZ, 2005). A capacidade emulsificante e/ou estabilizante da proteína ocorre por esta possuir uma porção hidrofílica (polar), e outra hidrofóbica (apolar), que atua na interface entre gordura e água, diminuindo a tensão interfacial entre as duas, unindo-as e evitando a saída e coalescência da gordura. A água interage com a porção polar e a gordura com a porção apolar da proteína (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2006).

Com o objetivo de reduzir o emprego de proteína cárnea empregada, a indústria atua hoje na produção de produtos cárneos emulsionados, utilizando a substituição de parte desta proteína por outras, de origem vegetal (soja), ou láctea (lactossoro) (ORDÓÑEZ, 2005). No Brasil utiliza-se em grande escala a proteína de soja, pela sua funcionalidade, disponibilidade no mercado e custo relativamente baixo se comparado com outras fontes, conseguindo-se assim a manutenção de uma boa estabilidade das massas cárneas, matendo a qualidade dos produtos (OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2006).

Quanto aos ingredientes para a produção do patê, a gordura empregada é um dos principais e segundo Schieffner *et al.* (1996) a quantidade ótima de gordura em patê deve estar compreendida entre 20 e 60%, e seus extremos influenciam na qualidade final do produto. Um patê que possui teor de gordura inferior a 20% perde sua untuosidade característica e se resseca, apresentando um aspecto repulsivo ao ser embutido, e ao ressecar-se forma uma capa externa acinzentada. Se este contém gordura suficiente e bem distribuída evita-se a perda de água aumentando a resistência do patê a longos períodos de conservação sem deterioração. A gordura a ser empregada pode ser mole ou dura, e fresca, determinando o aroma do produto final.

As operações básicas de produção de patê consistem em: triturar a matéria-prima em cutter, realizar a mistura com adição do sal de cura, posteriormente adiciona-se a água e os condimentos, realiza-se a adição de toucinho, proceder-se nova mistura (SILVA *et al.* 2000). Leva-se a massa cárnea para o processo de cozimento a temperatura inicial é de 60°C com posterior elevação para 80-85°C, de modo que a temperatura interna atinja 75°C, conforme o descrito por TERRA, (1998). O embutimento do produto antes do cozimento irá depender da embalagem a ser utilizada.

3.3.1.1 Oxidação Lipídica em Patê

Além da deterioração microbiana, a oxidação lipídica é o maior fator redutor da qualidade e aceitabilidade da carne e produtos cárneos (MORRISSEY, *et al.* 1998). Segundo Sarantópoulos *et al.* (2001) no processo de oxidação há a formação de peróxidos e sua decomposição origina compostos voláteis, responsáveis pelo sabor e odor rançosos característicos.

Miller *et al.* (1994a) e Miller *et al.* (1994b) sugeriram que o cozimento não é o mais importante, e sim, a subsequente refrigeração dos produtos cárneos cozidos que promovem a liberação do ferro não-heme (considerado como o principal responsável pela promoção da oxidação da carne).

Vários são os fatores que influenciam o nível de gordura nas carnes, como a espécie animal (bovino, suíno, ovino, aves, etc.), a raça, o sexo, a idade e a dieta

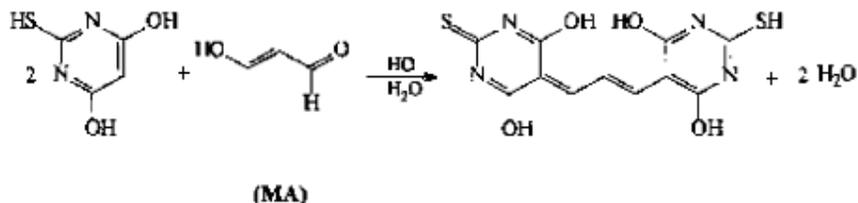
(BAGGIO, 2004). Os lipídios do tecido adiposo da carne constituem 2,0 a 4,0% do total da gordura e compreendem alguns fosfolipídios contendo 25% e acima de 19% de ácidos graxos, respectivamente com duas, três, quatro ou mais insaturações. São esses os responsáveis pela rancidez, especialmente pelo fato de se encontrarem próximo dos catalisadores (heme) (ARAÚJO, 1999).

Como a oxidação lipídica acarreta uma série de modificações organolépticas nos produtos cárneos, além da diminuição do conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, cujo efeito para a saúde é bem documentado (ALEXANDER, 1998; BERRA *et al.*, 2005; ROSE & CONOLLY, 1999). Sabe-se que alguns dos produtos intermediários e finais da reação de oxidação são potencialmente tóxicos à saúde humana, tal como os compostos da oxidação do colesterol (KUBOW, 1990; PANIANGVAIT *et al.*, 1995) e da polimerização dos triglicerídeos (ALEXANDER, 1978; CHANG *et al.*, 1978); além dos aldeídos com α e β insaturações, incluindo o malonaldeído que é reconhecido pelos seus efeitos tóxicos, carcinogênicos e mutagênicos (NEWBURG & CONCON, 1980). Portanto, estabelecer um método de controle da evolução da oxidação lipídica é fundamental para o controle da qualidade destes produtos.

A natureza e proporções relativas dos aldeídos provenientes de processos de degradação dependem muito do tipo de ácido graxo oxidado e das condições de oxidação (JADHAV *et al.*, 1996). Para o seu doseamento são freqüentemente usados alguns métodos colorimétricos:

Um dos métodos utilizados para acompanhar a evolução da oxidação lipídica em carnes e produtos cárneos é o teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA), trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MA), um aldeído com 3 átomos de carbono (ST. ANGELO, 1996).

Neste ensaio uma molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532-535 nm e apresenta máximos de absorção secundários a 245 e 305 nm (BERSET *et al.*, 1996; SIMS *et al.*, 1980; KOSUGI *et al.*, 1989). A reação ocorre em meio ácido (pH 1-2) e a alta temperatura (100°C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade (BERSET *et al.*, 1996).



Os resultados são normalmente expressos em unidades de absorvância por unidade de peso da amostra ou em "valor TBA" ou "número de TBA", definido como o peso, em mg, de MA por kg de amostra (SILVA *et al.*, 1999).

O teste tem sofrido modificações para aumentar a sensibilidade de detecção e eliminar interferências de outros constituintes da amostra. Paralelamente ao método espectrofotométrico para quantificação do complexo MA-TBA, recorre-se com freqüência à cromatografia líquida de alta resolução e à cromatografia gasosa (ST. ANGELO, 1996; FRANKEL, 1993; GUILLOT *et al.*, 1996; WONG *et al.*, 1995).

Apesar de freqüentemente usado, o teste do TBA apresenta limitações, tornando necessárias algumas precauções quanto ao significado atribuído às determinações realizadas:

- o MA forma-se unicamente a partir dos ácidos graxos possuindo pelo menos três duplas ligações. Na realidade, o teste TBA não entra em linha de conta com os derivados do linoleato ou oleato;;

- o MA não é o único produto de oxidação dos lipídios que reage com o TBA: os 4-hidroxiacetaldeídos, os 2,4-diacetaldeídos e os 2-acetaldeídos formam igualmente um cromogênio. Por essa razão parece preferível falar em "substâncias que reagem com o TBA" (TBARS), (JADHAV *et al.*, 1996; BERSET *et al.*, 1996; HAMILTON *et al.* 1983).

- a falta de especificidade do teste não se limita aos compostos anteriormente referidos. Particularmente quando o teor de MA é baixo, outros aldeídos não provenientes do processo de degradação dos lipídios podem reagir com o TBA (*e.g.* acetaldeído e compostos da reação de Maillard). Os açúcares, nomeadamente a sacarose e a glicose, interferem exercendo um forte efeito sinérgico na formação de TBARS, superestimando dessa forma a extensão da oxidação. Por outro lado, o MA pode não reagir com o TBA devido à sua complexação com proteínas, amins e outros compostos (FRANKEL, 1993; JADHAV *et al.*, 1996; BERSET *et al.*, 1996; WONG *et al.*, 1995).

Na determinação da oxidação lipídica pelo teste das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), todas as análises devem ser feitas através de um único meio de extração. Desta forma, as mudanças dos valores de TBARS para uma situação em particular ou um determinado tipo de produto cárneo pode mostrar o comportamento da oxidação dos lipídeos que ocorre durante todo o processamento e/ou armazenamento (RHEE, 1989; RAHARJO & SOFOS, 1993).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Teste da sensibilidade da cultura probiótica frente à concentração de cloreto de sódio (NaCl) e nitrito de sódio (NaNO₂)

A linhagem do microrganismo foi testada frente à concentração de NaCl e NaNO₂. Primeiramente realizou-se a reativação dos microrganismos, conforme as especificações do fabricante, sendo então retiradas alíquotas de 0,1% até a concentração 10⁻¹¹UFC/mL. Posteriormente semeou-se 1mL de cada concentração em placas de Petri e em seguida adicionou-se o Ágar MRS adicionado de NaCl e NaNO₂. O Ágar MRS foi suplementado com NaCl nas concentrações de 1,0%, 1,5% e 2,0%, concentrações normalmente utilizadas na elaboração de produtos cárneos, conforme o descrito por Carr, Chill e Maida, (2002). Os testes de resistência ao nitrito de sódio foram realizados pelo mesmo procedimento, sendo adicionado o nitrito de sódio nas quantidades de 150, 200 e 250ppm ao Ágar MRS. As concentrações de nitrito de sódio utilizadas foram baseadas na Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998 que aprova o Regulamento Técnico: Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos, Brasil (1998), utilizou-se uma concentração acima de limite estabelecido que é de 150ppm e uma concentração abaixo do limite estabelecido com o objetivo de verificar o comportamento do microrganismo frente a estas concentrações (ARIHARA e ITOH, 2000). Da mesma forma foram realizados testes adicionando-se ao meio, Ágar MRS, o NaCl + NaNO₂, para verificação do comportamento deste microrganismo frente a ação combinada destes dois sais. As concentrações utilizadas foram: 1,0%NaCl + 150ppm de NaNO₂; 1,0%NaCl + 200ppm de NaNO₂; 1,0%NaCl + 250ppm de NaNO₂; 1,5%NaCl + 150ppm de NaNO₂; 1,5%NaCl + 200ppm de NaNO₂; 1,5%NaCl + 250ppm de NaNO₂; 2,0%NaCl + 150ppm de NaNO₂; 2,0%NaCl + 200ppm de NaNO₂; 2,0%NaCl + 250ppm de NaNO₂; paralelamente também foi realizado um teste controle, onde se semeou 1mL do inóculo em Ágar MRS puro para comparação do crescimento da linhagem de *Bifidobacterium lactis* com os demais testes realizados. Posteriormente as placas

foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37°C por 72 horas e após o período de incubação realizou-se a contagem das colônias nas placas.

4.2 Elaboração de patê de presunto adicionado de microrganismo probiótico

4.2.1 Matéria-prima

- Carne Suína.

O pernil suíno resfriado, utilizado para a elaboração do patê de presunto, foi adquirido no comércio do município de Santa Maria – RS, sendo adquirido com 24 horas de antecedência a fabricação.

- Toucinho.

O toucinho congelado, utilizado na elaboração do patê de presunto foi adquirido no comércio do município de Santa Maria com 24 horas de antecedência a fabricação.

O pernil suíno e o toucinho foram transportados sob refrigeração até o laboratório de processamento de produtos cárneos do Colégio Politécnico da UFSM, sendo o pernil armazenado em câmara fria e o toucinho mantido sob congelamento até o momento do processamento.

4.2.2 Ingredientes

Os ingredientes utilizados na formulação do patê de presunto são apresentados na tabela 2. As percentagens utilizadas de condimentos e aditivos são baseadas em formulações comerciais, sendo apenas modificada a quantidade adicionada de cloreto de sódio.

Tabela 2 – Formulação Padrão de patê de presunto.

Matéria - Prima	Formulação Padrão (%)
Pernil Suíno	39
Toucinho	39
Ingredientes	
Água	16
Proteína Isolada de soja (PIS)	2,5
Condimento p/ Patê (pimenta, gengibre, mostarda, cravo, açúcar)	0,8
Tripolifosfato	0,4
Cura (NaCl, INS250, INS251)	0,25
Fixador (INS316)	0,25
Sal (NaCl)	1,8

Fonte: Indústria local (2008)

4.2.3 Processamento do Patê de Presunto

4.2.3.1 Cultura Probiótica

Foi utilizada cultura liofilizada de *Bifidobacterium lactis* (BLC 1), gentilmente cedida pela SACCO Brasil, localizada em Campinas – SP. As linhagens encontravam-se armazenadas em envelopes de alu-foil com 10 doses, pesando cerca de 5 gramas. Cada dose corresponde a um mínimo de 100 bilhões de células vivas, sendo recomendado o uso de uma dose, ou seja, 100 bilhões de células vivas, para 30 kg de produto.

4.2.3.2 Preparo do Inóculo

Foram preparados dois inóculos diferentes levando em consideração a concentração de microrganismos probióticos em cada tratamento. O cálculo realizado para a determinação das concentrações de cada inóculo foi realizado a

partir de regras de três; primeiramente determinou-se o peso (em gramas) de cada dose contida no envelope de alufoil, e posteriormente atribuiu-se a concentração esperada para os inóculos. :

- T1, com concentração final esperada de 10^6 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis* no patê de presunto;

- T2 com concentração final esperada de 10^8 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis* no patê de presunto;

Para este preparo seguiram-se as especificações do fornecedor das culturas probióticas, sendo que estas foram dissolvidas em vidros com água destilada e esterilizada, cerca de 30 minutos antes da inoculação no produto.

4.2.3.3 Produção do Patê de Presunto

As etapas de processamento do patê de presunto estão descritas a seguir.

4.2.3.4 Descrição das etapas de produção

O patê de presunto foi processado no Laboratório de Processamento de Carnes do Colégio Politécnico da UFSM, de acordo com o fluxograma apresentado na figura 1.

Primeiramente realizou-se o corte em cubos do pernil suíno e do toucinho, sendo ambos levados em recipientes separados, para cozimento em fogão industrial por 20 minutos. Após o cozimento a carne e a gordura foram trituradas em *cutter* com capacidade mínima de 5kg, afim de promover o rompimento dos tecidos das células e a melhor distribuição da gordura. Em seguida, adicionou-se o sal de cura, o NaCl, a proteína isolada de soja à matéria-prima triturada, provocando uma modificação estrutural nas proteínas auxiliando na formação da massa. Após a etapa de emulsificação realizou-se a adição do condimento para patê, responsável pelo *flavor* característico do produto, adicionou-se o tripolifosfato, o caldo de cozimento, proveniente do pernil, e o eritorbato. A massa cárnea foi novamente

misturada e adicionou-se 2,5mL de corante de carmin de coxonilha para conferir coloração rósea ao produto final.

A massa do patê foi envasada em vidros de 100g com tampa de rosca, rotulados, sendo imediatamente fechados e levados para o processo de pasteurização em banho-maria em recipientes fechados dispostos em fogão industrial, com controle de temperatura. O controle de temperatura foi realizado com a manutenção de termômetros em quatro vidros abertos dispostos em diferentes pontos do banho-maria, ao atingirem a temperatura de 80°C, manteve-se os vidros nesta temperatura por 30 minutos, até que o centro do produto atingisse os 75 ° (SCHMELZER-NAGEL, 1999).

Encerrando-se a etapa de cozimento, os vidros contendo o patê de presunto foram resfriados à temperatura de 40°C com água e gelo e levados para capela de fluxo laminar para o procedimento de inoculação do microrganismo probiótico. Os Apêndices 1, 2 e 3 apresentam algumas ilustrações das etapas de produção.

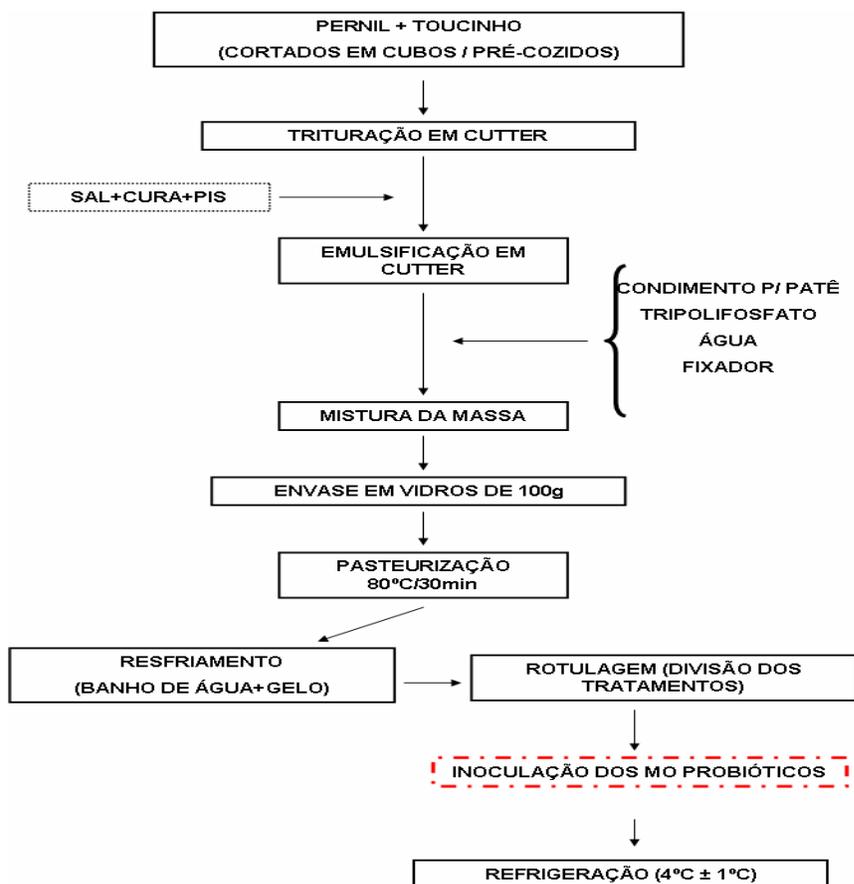


Figura 1 – Fluxograma geral de processamento do patê de presunto adicionado de Microrganismo Probiótico.

4.2.3.5 Inoculação dos microrganismos probióticos (*Bifidobacterium lactis*)

A determinação da temperatura de 40°C para inoculação dos microrganismos probióticos no patê de presunto foi realizada a partir de testes preliminares de resistência do microrganismo a diferentes temperaturas. Nestes testes uma formulação de patê de presunto foi processada conforme descrito anteriormente e realizou-se a inoculação de *Bifidobacterium lactis* em diferentes temperaturas (40°C, 50°C e 60°C), onde se observou uma resistência destes microrganismos com maior viabilidade na temperatura de 40°C (Apêndice 4).

Na capela de fluxo laminar, em condições assépticas, realizou-se o procedimento de inoculação dos microrganismos, sendo que a massa contida em cada vidro de cada tratamento recebeu 1mL de inóculo.

O experimento constou de dois tratamentos codificados como T1 e T2, e um Controle, codificado como C, conforme descrito a seguir:

- Controle (C) = formulação padrão de patê de presunto sem adição de *Bifidobacterium lactis*;

- T1 = formulação padrão com adição de microrganismo probiótico com concentração final esperada de 10^6 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis* no patê de presunto;

- T2 = formulação padrão com adição de microrganismo probiótico com concentração final esperada de 10^8 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis* no patê de presunto.

Após a inoculação os tratamentos foram submetidos à refrigeração onde foram mantidos a 4°C ± 1°C para realização posterior das análises.

4.3 Avaliação dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais do patê de presunto adicionado de microrganismo probiótico durante o seu período de armazenamento

4.3.1 Amostras analisadas

As análises foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21 e 31, correspondentes ao período de armazenamento do produto, à temperatura de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata, sendo que cada amostra da duplicata foi inoculada em duas placas totalizando quatro valores de contagens. As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata.

4.3.2 Análises físico-químicas

4.3.2.1 Composição Centesimal do produto elaborado

Após a elaboração (tempo 0 de armazenamento) do patê de presunto foram realizadas as análises para determinação da sua composição centesimal, conforme a Instrução Normativa nº 21, de 31 de Julho de 2000 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de patê do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2000).

Os procedimentos analíticos utilizados para a determinação de gordura (Sohxlet), proteína (Kjehdal), umidade e cinzas, seguiram metodologias da AOAC (2002).

4.3.2.2 Determinação do pH

O pH foi determinado seguindo metodologia descrita na AOAC (2002), sendo coletado 10g de amostra de Patê de Presunto que foi homogeneizada com 100mL de água destilada. A medida foi realizada utilizando pHmetro digital, da marca Digimed[®], com eletrodo de vidro combinado, sendo previamente calibrado com tampão pH 4 e pH 7.

4.3.2.3 Determinação da Oxidação Lipídica (TBARS)

O Índice de TBARS (ácido 2-tiobarbitúrico) foi realizado seguindo metodologia proposta por Raharjo *et al.*(1992) realizando-se algumas modificações conforme Drehmer (2005). Duas amostras de cada tratamento de 10g cada foram coletadas e adicionadas de 40mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5% , mais 1mL de antioxidante Butil Hidroxitiobarbitúrico - BHT 0,15% e homogeneizadas por 1 minuto em Bag mixer. Logo após, realizou-se a filtração e o volume foi ajustado para 50mL em balão volumétrico com TCA 5%. Destes balões foram retirados, com pipeta volumétrica, alíquotas de 2mL e colocadas em tubo de ensaio (2 tubos para cada balão), onde adicionou-se 2mL do reagente de TBA 0,08M em ácido acético 50% homogeneizando-se. Em seguida os tubos foram levados para banho-maria por 5 minutos em água fervente.

Logo após a saída das amostras do banho-maria realizaram-se as leituras das absorbâncias através de espectrofotômetro a 531 nanômetros. Os valores foram expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mgMA/kg), através do cálculo: valor da absorbância lida x 7,38 (fator de correção para as leituras das absorbâncias).

4.3.3 Análises Microbiológicas

Para a realização das análises microbiológicas foram coletadas duas amostras de 25g do Controle (C) e dos tratamentos T1 e T2. As amostras de 25g de patê de presunto foram transferidas para sacos estéreis coletores de amostra, adicionados de 225mL de água peptonada, exceto para análise de *Salmonella* sp. onde a água peptonada era substituída pela água peptonada tamponada, as amostras foram então levadas para Stomacker onde eram homogeneizadas por 60 segundos, a amostra diluída era então considerada como a diluição 10^{-1} ; a partir desta diluição uma alíquota de 1mL foi transferida para um tubo contendo 9mL de solução de água peptonada estéril 0,1%. A partir desta diluição foram realizadas as diluições subseqüentes conforme o necessário para análise do produto. Após o tempo de incubação requerido para cada meio de cultura, a contagem foi realizada em placas de Petri que apresentaram entre 25 e 250 colônias.

4.3.3.1 Contagem de microrganismos deteriorantes

Foram realizadas contagens estimadas da população de Coliformes Termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positivo, *Clostridium* sulfito redutores e *Salmonella* sp., seguindo exigências da Resolução nº 12, de 02 de Janeiro de 2001 da ANVISA, Brasil (2001); e metodologia descrita em Brasil (2003).

Para a enumeração dos Coliformes Termotolerantes (coliformes a 45°C), realizou-se a semeadura das alíquotas das diluições das amostras em profundidade nas placas de Petri. Adicionando-se o meio de cultura Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRB). Após a solidificação da primeira camada, foi adicionada uma sobre camada visando à prevenção do crescimento e espraiamento de colônias na superfície do Ágar. As placas foram incubadas invertidas em estufa a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ /24h. Esta prova presuntiva de enumeração de coliformes revela a fermentação da lactose pelos microrganismos presentes, através de um indicador de pH e a inibição das bactérias Gram-positivas ocorre pela presença de sais biliares e cristal violeta do Ágar VRB. As provas confirmativas da presença de Coliformes Termotolerantes só

são realizadas se a prova presuntiva apresentar o crescimento de colônias nas placas, de acordo com metodologia descrita em Brasil (2003).

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada com inoculação das diluições desejadas das amostras de patê em Ágar Baird-Parker (plaqueamento em superfície), o qual evidencia a habilidade deste microrganismo em crescer na presença de Telurito de Potássio combinado com Cloreto de Lítio e Glicina. Nesta contagem verifica-se a redução anaeróbica e aeróbica pelo *Staphylococcus* do Telurito de Potássio a telúrio, produzindo colônias negras; a suplementação do meio de cultura com gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolíticas e lipolíticas do *Staphylococcus*, por meio do aparecimento de um halo de transparência e um de precipitação ao redor da colônia. Caso seja verificada a presença destas colônias típicas nas placas incubadas invertidas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ /48h, realiza-se além da contagem das colônias, a prova da coagulase, onde se verifica a capacidade do microrganismo coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida por este microrganismo BRASIL (2003).

A contagem de *Clostridium* Sulfito Redutores foi realizada através da inoculação, em profundidade, das diluições desejadas (10^{-1} a 10^{-3}) das amostras em placas de Petri, as quais foram adicionadas de cerca de 15mL do meio Ágar SPS. Em seguida foi adicionado mais uma sobrecamada de meio SPS e realizou-se a colocação das placas em jarras de anaerobiose a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24horas. Nas condições de anaerobiose o *Clostridium* forma colônias negras devido à reação de redução de sulfito a sulfeto, que reage com citrato de amônio e ferro III, formando um precipitado negro. Selecionam-se placas contendo de 20 a 200 colônias para contagem BRASIL (2003).

A análise para detecção de *Salmonella* sp. foi realizada conforme a metodologia descrita por Brasil (2003), onde realiza-se as etapas de pré-enriquecimento da amostra através da incubação da mesma a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 20horas, adicionada de água peptonada tamponada, visando a recuperação de células do microrganismo que possam estar injuriadas devido ao processamento do alimento. Para o enriquecimento seletivo, segunda etapa, utilizou-se meios que contêm substâncias que impedem o crescimento da maioria dos microrganismos interferentes. Para tanto, foram utilizados o caldo Rappaport Vassiliadis e caldo Selenito-cistina, além do caldo Tetracionato. Os tubos contendo a amostra foram incubados a $41^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 24horas. Em placas contendo o Ágar Rambach e

Ágar SS foi realizado a etapa de Isolamento e Seleção de colônias de *Salmonella*. Caso haja o crescimento de colônias nestes meios de cultura realizam-se os testes bioquímicos, de identificação bioquímica, onde se verifica e evidencia as propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas. Para confirmação final em caso de dúvida, realizam-se outras provas complementares, baseadas na inoculação das culturas suspeitas em uma bateria miniaturizada de testes padronizados.

4.3.3.2 Contagem estimada da população de *Bifidobacterium* sp.

A contagem estimada da população de *Bifidobacterium* sp., foi determinada e expressa em unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC.g⁻¹).

Utilizou-se o meio de cultura Ágar De Man Rogosa & Sharp – MRS-IM com glicose adicionado de solução de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloridrato de cisteína. A técnica utilizada foi a de semeadura em profundidade. Foram feitas semeaduras em duplicata para cada diluição, sendo a superfície das placas recoberta com uma sobre camada do meio MRS-IM, para geração de uma atmosfera microaerófila. Após a inoculação nas placas, estas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac), a 37°C por 72 horas. (CHRISTIAN HANSEN, 1999).

4.3.4 Análise Sensorial

A avaliação sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial no Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Rurais, na UFSM, contando com a participação de 62 provadores não-treinados, sendo estes alunos de graduação, pós-graduação, funcionários e docentes da UFSM. A metodologia utilizada baseou-se na norma técnica NBR 12994 da ABNT (1993), que estabelece os métodos de análise sensorial dos alimentos e bebidas. Para tanto foram utilizados os métodos subjetivos utilizando escala hedônica, para

expressar o grau de aceitação, e escala de atitude para expressar atitudes ou opiniões dos avaliadores (ABNT, 1993).

4.3.4.1 Teste Afetivo de Aceitação

Na análise sensorial foi aplicado o teste de aceitação nas duas amostras tratadas com *Bifidobacterium lactis*, sendo servidas em cabines individuais. Amostras de aproximadamente 10 gramas do produto foram servidas em recipientes de porcelana branca, codificados com três dígitos, acompanhadas da ficha de avaliação sensorial. Além disso, foram oferecidos faca descartável, prato descartável com bolacha do tipo água e sal e um copo de água para serem utilizados pelos provadores entre as amostras. A aplicação do Teste Afetivo de Aceitação foi realizada no período da manhã, das 9h30min às 11h30min, a partir do segundo dia após o processamento do patê de presunto adicionado de *Bifidobacterium lactis*. Para o Teste Afetivo de Aceitação (Apêndice 5), utilizou-se a escala hedônica estruturada de sete (7) pontos, em que as avaliações variaram de desgostei muitíssimo (valor 1) e gostei muitíssimo (valor 7), sendo que o valor de avaliação 4 representava (Indiferente – não gostei nem desgostei).

4.3.4.2 Teste de Intenção de Compra

O teste de Intenção de Compra do produto foi realizado juntamente com o teste afetivo de aceitação (Apêndice 5) e incluiu 5 opções de compra. Foi utilizada uma escala de atitude de cinco pontos, na qual as avaliações variaram de certamente eu não compraria (valor 1) a certamente eu compraria (valor 5), sendo o valor 3 indicativo da opção (talvez eu compraria/talvez não compraria).

4.3.5 Análise Estatística

Para verificar se existe efeito dos tratamentos ao longo do período estudado, foi realizada análise estatística através da análise de variância com parcelas subdivididas no tempo. Para análise sensorial foi realizado o Teste de Aceitação e Intenção de Compra nas duas amostras tratadas e depois aplicado o teste t de Student. Foi utilizado para tanto o pacote estatístico SAS 9.1.3 Institute Inc., Cary, NC, USA. O nível de significância utilizado para o tratamento dos dados foi de 5%.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1 Teste da sensibilidade da cultura probiótica frente à concentração de cloreto de sódio (NaCl) e sal de cura (NaNO₂)

A linhagem de *Bifidobacterium lactis*, testada frente as concentração de NaCl de 1,0%, 1,5% e 2,0%, adicionadas ao Ágar MRS, apresentaram crescimento em todos os testes realizados. As contagens de células viáveis foram expressivas conforme o que pode ser observado na tabela 3. Para o teste de sensibilidade ao sal de cura (NaNO₂) nas concentrações de 150ppm, 200ppm e 250ppm, também se observou crescimento da linhagem de *Bifidobacterium lactis* em todos os testes (tabela 4), concordando com os resultados encontrados por MACEDO *et al.*, 2005, que testaram linhagens de bactérias lácticas com propriedades probióticas frente a concentrações de Cloreto de Sódio e Sal de Cura, para serem aplicadas em produtos cárneos fermentados e encontraram valores de 7×10^8 UFC.g⁻¹ e $3,1 \times 10^9$ UFC.g⁻¹ para espécies probióticas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus ramnosus*. O teste de resistência dos microrganismos realizado com a adição da combinação destes dois sais adicionados ao Ágar MRS, apresentaram crescimento de células viáveis em todas as concentrações adicionadas conforme o observado na tabela 5. Os resultados destes testes de resistência da cultura probiótica frente à combinação destes dois sais de cura utilizados em muitos produtos cárneos, permitiram avaliar que a linhagem de *Bifidobacterium lactis* pode ser aplicada em produtos cárneos nestas concentrações.

Tabela 3 – População microbiana de *Bifidobacterium lactis* (Log UFC.g⁻¹), submetida a diferentes concentrações de NaCl.

	Concentrações (NaCl)		
	1,0%	1,5%	2,0%
Log UFC.g ⁻¹	11	9,2	9

Tabela 4 – População microbiana de *Bifidobacterium lactis* (Log UFC.g⁻¹), submetida a diferentes concentrações de NaNO₂.

	Concentrações (NaNO ₂)		
	150 ppm	200 ppm	250 ppm
Log UFC.g ⁻¹	10	9	9

Tabela 5 – População microbiana de *Bifidobacterium lactis* (Log UFC.g⁻¹), submetida a combinação de diferentes concentrações de NaCl e NaNO₂.

Combinação dos Sais	Log UFC.g ⁻¹
1,0%NaCl + 150ppm de NaNO ₂	10,2
1,0%NaCl + 200ppm de NaNO ₂	10
1,0%NaCl + 250ppm de NaNO ₂	9,5
1,5%NaCl + 150ppm de NaNO ₂	9,3
1,5%NaCl + 200ppm de NaNO ₂	9
1,5%NaCl + 250ppm de NaNO ₂	9
2,0%NaCl + 150ppm de NaNO ₂	8,9
2,0%NaCl + 200ppm de NaNO ₂	8,4
2,0%NaCl + 250ppm de NaNO ₂	8,5

5.2 Caracterização Físico-química do produto

5.2.1 Determinação da Composição Centesimal

A determinação da composição centesimal do patê de presunto apresentou resultados que demonstram que o produto elaborado encontra-se em conformidade com o estabelecido pela Instrução Normativa nº 21 de 31 de Julho de 2000, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, Brasil (2000). As análises realizadas em triplicata apresentaram valores para umidade, proteína,

gorduras e cinzas que não diferiram significativamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, indicando que a adição de *Bifidobacterium lactis* nos tratamentos T1 e T2 não influenciou significativamente na composição centesimal do produto elaborado (tabela 6).

Tabela 6 - Composição Centesimal média do patê de presunto adicionado de microrganismo probiótico.

Determinação	g % (valores médios) Tratamentos*#			Valores estabelecidos pela legislação
	C*	T1**	T2***	
Umidade	50,1	50,2	50,2	Máx. 70%
Proteína	18	18,2	18	Mín. 8%
Gordura	26,2	26	26,3	Máx. 32%
Cinzas	3,7	3,7	3,6	—

* C – Controle, sem adição de probiótico

** T1 – Tratamento com adição de 10^6 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

*** T2 – Tratamento com adição de 10^8 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

as médias das determinações da composição centesimal do patê de presunto não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

5.2.2 Determinação de pH

Na determinação do valor do pH durante a estocagem do patê de presunto, buscou-se avaliar se existiu efeito nos tratamentos ao longo do período de armazenamento.

A evolução do pH pode ser observada na figura 2 e Apêndice 6, onde estão demonstradas as curvas de regressão ajustadas para o pH. Observa-se que todos os tratamentos (C, T1 e T2) apresentaram elevação nos valores de pH, partindo os tratamentos T1 e T2 de um mesmo patamar, encontrando-se o controle com valores um pouco abaixo de T1 e T2 nos sete primeiros dias.

O valor do pH para o Controle, o T1 e T2 apresentou um comportamento crescente linear. O Controle apresentou uma variação nos seus valores de pH de

6,1 ± 0,1 a 6,5 ± 0,01, já o tratamento T1 apresentou uma variação nos seus valores de pH de 6,2 ± 0,01 a 6,6 ± 0,01; e o T2 apresentou uma variação de pH de 6,2 ± 0,01 a 6,5 ± 0,01. Portanto verificou-se que existiu efeito significativo na interação entre os tratamentos T1, T2 e o controle com os dias de armazenamento, ocorrendo elevação nos valores de pH para todos no período avaliado de 31 dias de armazenamento.

Estes valores finais de pH do tratamento T1 e T2, girando em torno de 6,5, são fatores que favorecem a manutenção da viabilidade celular dos microrganismos probióticos como as do gênero *Bifidobacterium*, de acordo com Corrales *et al.*, 2007 valores de pH próximos a (6,5±1), permitem um período de vida útil maior em relação a outros alimentos probióticos originados por fermentação, nos quais o pH baixo influencia diretamente na sobrevivência deste tipo de microrganismo probiótico. Considerando que os valores de pH característicos para o produto patê são de 6,2 a 6,5 ± 1 (Brasil, 2000); verifica-se que a linhagem de *Bifidobacterium lactis* inoculada no T1 e T2 não interferiu nas características do produto durante os 31 dias de armazenamento avaliados, sendo este um substrato viável para a manutenção destes microrganismos. No estudo realizado por Vermeiren *et al* (2006), no qual foi inoculado uma concentração de 10⁶ UFC.g⁻¹ de *Lactobacillus sakei* 10A em patê, para verificar a influência do microrganismo na alteração das características sensoriais do produto, verificou-se que a produção de ácido láctico pela linhagem de *Lactobacillus sakei* 10A, provocou alterações no valor de pH do produto variando seus valores de pH 6,43 para 6,09 com 24 dias de armazenamento, esta queda nos valores do pH foi detectado pelos avaliadores, na avaliação sensorial, sendo o produto considerado por eles inapto para consumo devido ao excesso de sabor ácido não característico do patê.

Comparando as variações ocorridas nos valores de pH do controle (C) de 6,1 ± 0,1 a 6,5 ± 0,01; com os do tratamento controle do estudo de Silva *et al.* (2003), o qual avaliou valores de pH em patês de presunto adicionados de diferentes emulsionantes em função do tempo de armazenamento, pode-se verificar um comportamento semelhante. Silva *et al.* (2003) encontrou valores para o pH do controle que variaram de 6,45 a 6,61 em 45 dias de armazenamento de patê de presunto sob refrigeração. Farber *et al.* (1995), em seu estudo para avaliação dos efeitos de diversos parâmetros no crescimento de *Listeria monocytogenes* em patê de fígado, encontrou valores inferiores de pH que variaram de pH 6,00 a 6,15

durante avaliação da estocagem do patê sob refrigeração a 4°C; valores estes considerados normais para patê de fígado. Desta forma verifica-se a importância da manutenção dos valores de pH característicos para cada produto específico auxiliando na manutenção das suas características.

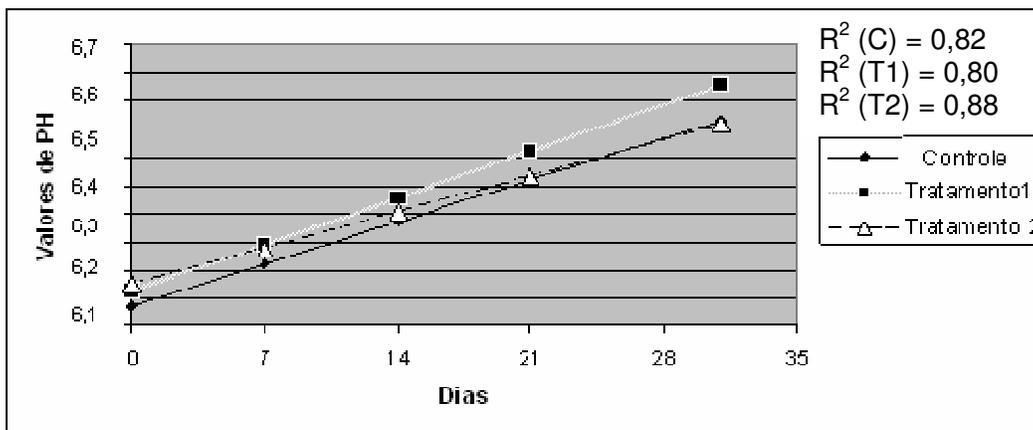


Figura 2 - Curvas de regressão ajustadas para o pH, conforme o modelo estimado, para cada tratamento.

5.2.3 Determinação da Oxidação Lipídica (TBARS)

Observando a figura 3 e Apêndice 7, verifica-se que dentre as três amostras analisadas, a oxidação lipídica foi mais acentuada para o controle (C), que atingiu um valor de 0,044mg após 31 dias de armazenamento. Os tratamentos T1 e T2 apresentam um comportamento muito semelhante com pouca variação ao longo do período de armazenamento, apresentando valores para TBARS de 0,013 a 0,017mg de malonaldeído/kg. Observando as variações nas determinações de TBARS ao longo do período de armazenamento pode-se verificar que houve uma interação significativa entre as amostras de patê de presunto avaliadas e os 31 dias de armazenamento.

Considerando que a diferença entre os tratamentos controle, T1 e T2 está na presença de *Bifidobacterium lactis*, pode-se sugerir uma influência deste microrganismo na estabilização da oxidação lipídica nos tratamentos T1 e T2.

Comparando o controle com o estudo de Silva *et al.* (2003), que avaliou a adição de diferentes emulsificantes em patê de presunto, os valores para TBARS encontrados pelo autor foram bem superiores (0,2 a 0,8 mg de malonaldeído por kg de amostra – mgMAL/kg) durante um período de 45 dias de armazenamento sob refrigeração. Da mesma forma, Estévez *et al.* (2006), estudando o emprego de antioxidantes em patê de fígado, encontrou valores superiores (0,35 mgMAL/kg para suínos ibéricos e 0,83 mgMAL/kg para suínos brancos) no produto armazenado sob refrigeração a 4°C, mesmo após a aplicação de diferentes antioxidantes sintéticos e naturais. Bote *et al.* (2005), sugere que a evolução da oxidação lipídica em carne e produtos cárneos suínos sofre muitas variações, podendo algumas vezes alcançar valores de 1,5 a 2 mg de malonaldeído/kg em poucos dias, e, algumas vezes a oxidação pode ocorrer tão lentamente que não chega a ser considerada um problema. O autor ressalta ainda que alguns fatores de variação e suas interações não são muito conhecidos, existem informações que demonstram que a suscetibilidade dos tecidos de sofrer processos de oxidação depende da alimentação recebida pelo animal, fundamentalmente do tipo de ácido graxo e da presença de agentes antioxidantes nos tecidos, portanto, pode se considerar que o tratamento recebido pelo animal que originou a matéria-prima para o processamento do patê, pode ter influenciado no retardamento da oxidação lipídica do produto.

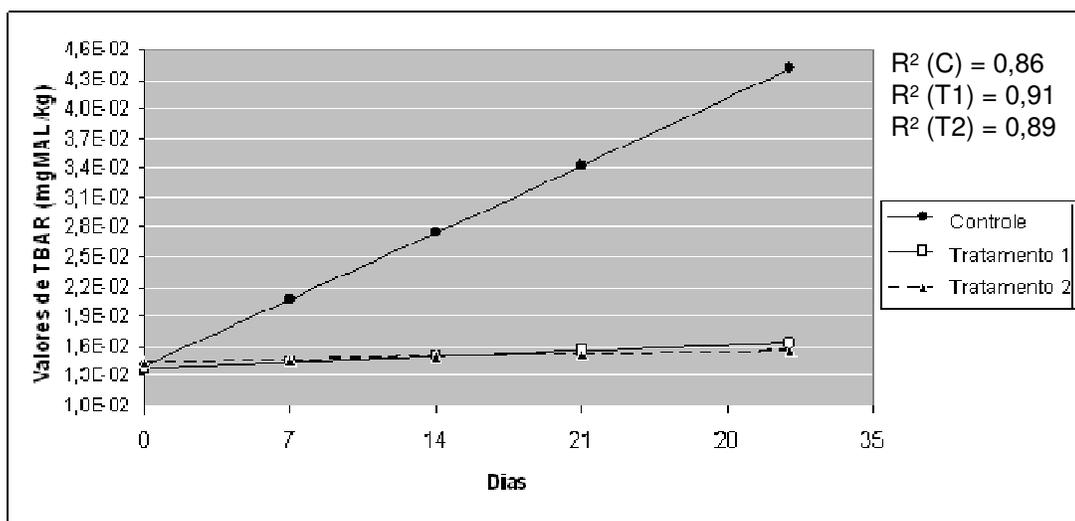


Figura 3 - Curvas de regressão ajustadas para TBARS, conforme o modelo estimado, para cada tratamento.

5.3 Características microbiológicas do produto

5.3.1 Contagem de microrganismos contaminantes

Os resultados das contagens de microrganismos contaminantes no patê de presunto apresentaram-se bastante satisfatórias (tabela 7). Todas as análises realizadas para *Staphylococcus* coagulase positiva, Coliformes a 45°C e *Clostridium* sulfito redutor tiveram resultados que se enquadram dentro do estabelecido na RDC nº12 da ANVISA, Brasil, (2001) a qual determina para este tipo de alimento padrões microbiológicos para *Staphylococcus* coagulase positiva de no máximo 3×10^3 UFC.g⁻¹, para Coliformes a 45°C de no máximo 10^3 UFC.g⁻¹ e *Clostridium* sulfito redutor de no máximo 5×10^2 UFC. g⁻¹.

A análise de *Salmonella* sp. realizada nos três tratamentos apresentou resultados em conformidade com a RDC nº 12 da ANVISA, Brasil, 2001), que determina a ausência deste microrganismo em 25g do alimento.

Como o produto apresentou em suas análises microbiológicas, valores muito inferiores aos estabelecidos pela legislação para contagem de microrganismos contaminantes, demonstra que é um produto apto para consumo, seguindo os padrões de higiene e manipulação adequados durante o seu processamento e armazenamento refrigerado a 4°C.

Tabela 7 - Análises microbiológicas (log UFC.g⁻¹) realizadas durante o período de armazenamento do patê de presunto inoculado com *Bifidobacterium lactis*.

Dias	Trat.*	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	Coliformes a 45°C	<i>Clostridium</i> sulfito reductor
0	C	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T1	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T2	< 1,00	< 1,00	< 1,00
7	C	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T1	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T2	< 1,00	< 1,00	< 1,00
14	C	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T1	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T2	< 1,00	< 1,00	< 1,00
21	C	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T1	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T2	< 1,00	< 1,00	< 1,00
31	C	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T1	< 1,00	< 1,00	< 1,00
	T2	< 1,00	< 1,00	< 1,00

* C – Controle, sem adição de probiótico

T1 – Tratamento com adição de 10⁶ UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

T2 – Tratamento com adição de 10⁸ UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

5.3.2 Estimativa da população de *Bifidobacterium lactis*

Observa-se na tabela 8, que no tratamento T1 os valores da estimativa da população de *Bifidobacterium lactis* se mantêm estáveis do 1º ao 14º dia, ou seja, apresentando contagens de 10⁶ UFC.g⁻¹. A partir do 21º dia, ocorreu um decréscimo de um ciclo logarítmico, permanecendo o produto com uma concentração de 10⁵ UFC.g⁻¹ até o 31º dia de armazenamento. O tratamento T2 apresentou uma estimativa de população inicial de 10⁸ UFC. g⁻¹ no patê de presunto, sendo mantida esta concentração logarítmica até o 21º dia. No entanto, apresentou uma diminuição de um ciclo logarítmico após o 21º dia, chegando ao 31º dia de armazenamento com uma estimativa de população de *Bifidobacterium lactis* de 10⁷ UFC. g⁻¹. De acordo com Gomes e Malcata (1999) trabalhar em condições higiênicas adequadas e usar fatores promotores de crescimento são pré-requisitos para altas contagens iniciais

de células viáveis de probióticos. O uso destes fatores se faz necessário devido à baixa velocidade de multiplicação dos probióticos em relação, por exemplo, as bactérias lácticas.

A legislação suíça de alimentos estipula que a concentração mínima para um alimento ser considerado probiótico é de 10^6 UFC de *Bifidobacterium.g*⁻¹ no final do prazo de validade do produto que os contêm (ANON, 2002). Para Lücke, (2000); Tharmaraj & Shah, (2003) os alimentos com propriedades probióticas devem conter um número mínimo de população microbiana estimada em 10^6 UFC por grama do produto para obtenção de efeitos benéficos e colonização do intestino. Desta forma o tratamento T1 apresentou sua viabilidade como probiótico mantendo-se com 10^6 UFC. g⁻¹ até o 14^o dia de armazenamento, enquanto que o tratamento T2 manteve-se viável como alimento probiótico durante os 31^o dias de armazenamento. Urnau (2008) encontrou resultados de viabilidade de *Bifidobacterium sp.* em produto cárneo fermentado por um período de 30 dias, atingindo uma concentração final de 6,96 Log UFC.g⁻¹ no produto.

Tabela 8 – Estimativa da população de *Bifidobacterium lactis* durante período de armazenamento do patê de presunto (UFC.g⁻¹).

Dias	Controle	T 1*	T 2**
0	0	$5,6 \times 10^6$	$8,4 \times 10^8$
7	0	$2,4 \times 10^6$	$5,2 \times 10^8$
14	0	$4,4 \times 10^6$	$2,6 \times 10^8$
21	0	$6,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$
31	0	$4,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$

* T1 – Tratamento com adição de 10^6 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

**T2 – Tratamento com adição de 10^8 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

5.4 Análise Sensorial

Com o objetivo de verificar se existe diferença entre as médias dos tratamentos conforme o atributo (cor, aroma, sabor e textura) avaliado, realizou-se o teste t de Student. Na tabela 9, pode se verificar de maneira geral, que os parâmetros analisados variaram entre gostei moderadamente (valor 5) a gostei muito (valor 6), observando-se que existe diferença significativa apenas para o atributo aroma ao nível de 5% de significância. Verificou-se também que o atributo sabor foi o que apresentou maiores notas destacando-se o tratamento T1; segundo Ordóñez (2005); o sabor é uma característica organoléptica que possui grande influência na aceitação e escolha de um produto para consumo.

Tabela 9 - Teste de aceitabilidade para amostras de Patê de Presunto adicionado de *Bifidobacterium lactis* quanto aos atributos de cor, aroma, sabor e textura.

Tratamento	Atributos		
	Média	Valor do teste	*** P-valor
1	5,52	-0,16	0,87
2	5,55		
Aroma			
1	5,56	1,89	0,048
2	5,23		
Sabor			
1	6,13	1,16	0,25
2	5,95		
Textura			
1	5,85	0,25	0,80
2	5,81		

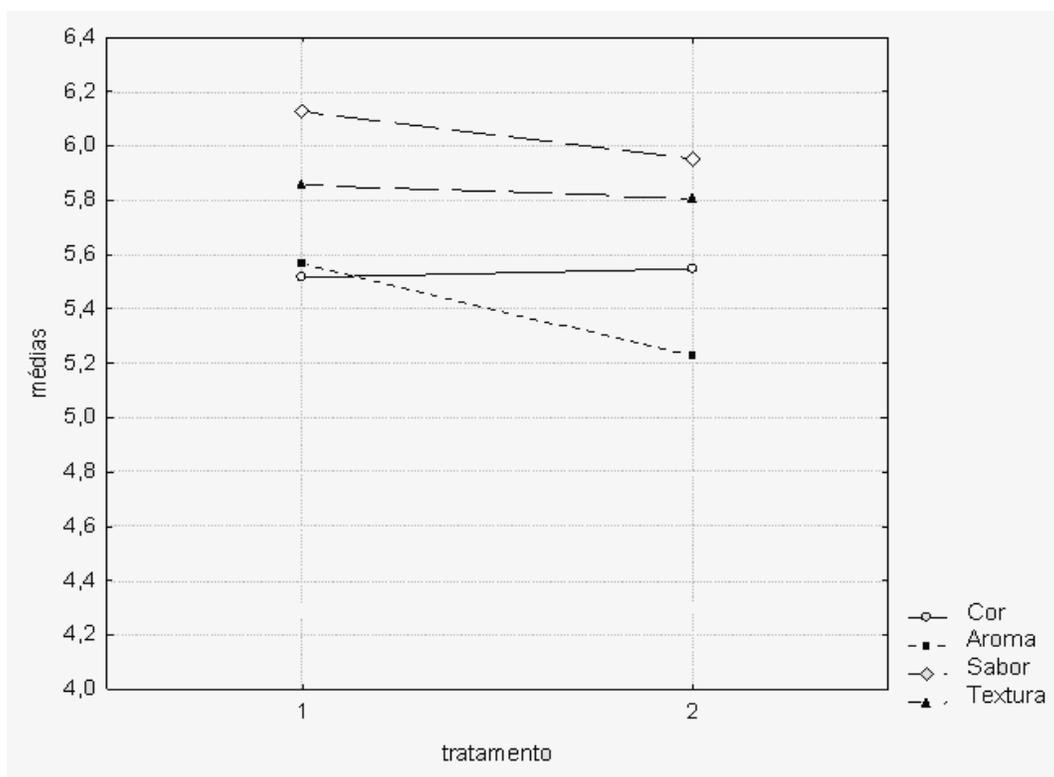
* T1 – Tratamento com adição de 10^6 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

**T2 – Tratamento com adição de 10^8 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

***Valor de probabilidade. em negrito as médias podem ser consideradas estatisticamente diferentes ao nível de 0,05%.

Observando os valores médios de cada atributo (cor, aroma, sabor e textura), apresentados na tabela 9 e na figura 4, que apresenta o gráfico com as médias de cada tratamento por atributo; observou-se que não existiu diferença significativa

quanto à aceitação global do patê de presunto; ocorrendo apenas uma maior distinção quanto ao aroma do produto. Considerando que o tratamento T1 e T2 receberam a adição de diferentes concentrações (10^6 UFC.g⁻¹ e 10^8 UFC.g⁻¹ respectivamente), de *Bifidobacterium lactis*, verificou-se que a aceitação do produto não foi influenciada pela adição de diferentes concentrações do microrganismo probiótico, mantendo as características globais do mesmo inalteradas. Urnau, 2008; encontrou resultados semelhantes para produto cárneo fermentado com microrganismo probiótico, onde a aceitação do produto elaborado também não foi afetada pela adição de probiótico, apresentando inclusive valores superiores quanto comparados ao produto fermentado controle.



* T1 – Tratamento com adição de 10^6 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

**T2 – Tratamento com adição de 10^8 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*

Figura 4 – Médias dos atributos de cor, aroma, sabor e textura em amostras de patê de presunto adicionado de *Bifidobacterium lactis*.

Quanto ao teste de intenção de compra realizado concomitantemente com o teste de aceitação. Observando-se o valor atribuído pelos avaliadores na figura 5 que representa o teste de intenção de compra com o comportamento dos

avaliadores frente ao tratamento T1 e a figura 6 que representa o teste de intenção de compra e o comportamento dos avaliadores frente ao tratamento T2, verifica-se que ambos os tratamentos foram aceitos pelos avaliadores recebendo o maior percentual das notas na escala de atitude de cinco pontos, correspondendo às avaliações: Certamente comprariam (valor 5) e provavelmente comprariam (valor 4). Desta forma, indicando que, para estes consumidores, o produto patê de presunto elaborado com a adição de *Bifidobacterium lactis* teria boa aceitação no mercado.

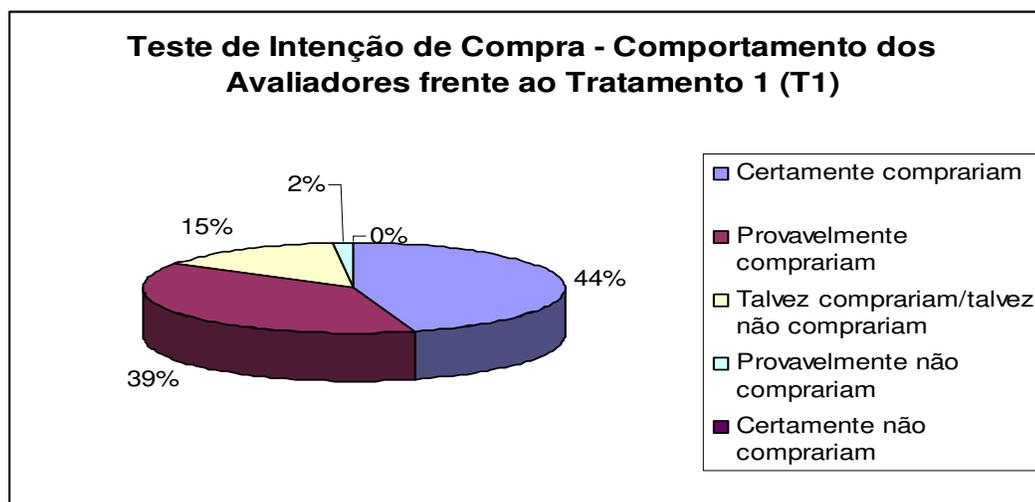


Figura 5 – Teste de Intenção de Compra – Comportamento dos Avaliadores frente ao Tratamento (T1).

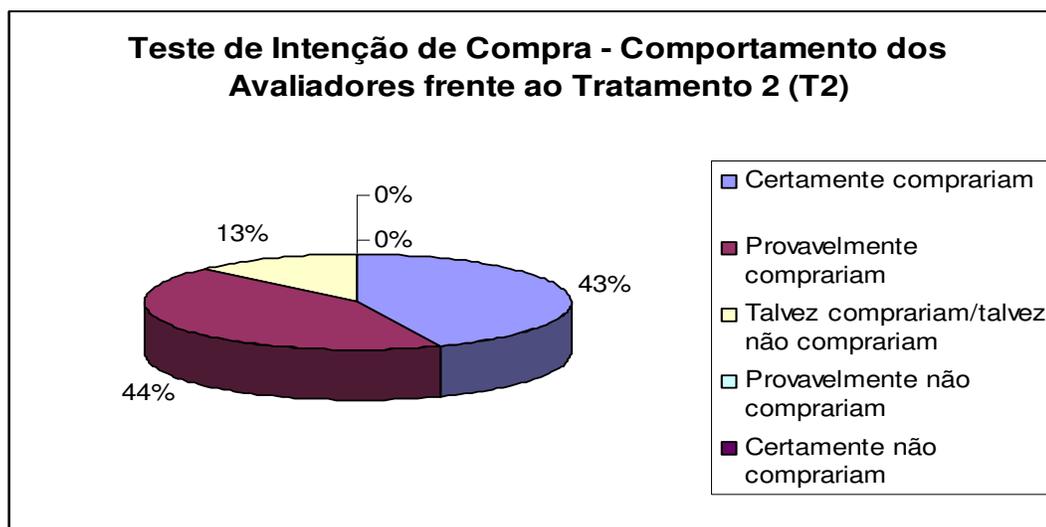


Figura 6 – Teste de Intenção de Compra – Comportamento dos Avaliadores frente ao Tratamento (T2).

CONCLUSÃO

Com o presente trabalho pode-se concluir que:

- Existe resistência da linhagem de *Bifidobacterium lactis* a diferentes concentrações de sal de cura e de cloreto de sódio, o que facilita a sua aplicação em produtos cárneos;

- É possível produzir o Patê de Presunto realizando todas as etapas tradicionais do processamento e adicionar os microrganismos probióticos após o término destas sem causar danos ao produto;

- As avaliações de composição centesimal do produto elaborado, mostraram que este se enquadrou em todos os requisitos estabelecidos pela legislação vigente;

- As determinações físico-químicas de pH demonstraram que o controle e os tratamentos T1 e T2, apresentaram comportamento que viabilizou a manutenção das características do produto patê de presunto. Nos tratamentos T1 e T2 os valores de pH auxiliaram na manutenção de células viáveis de Bifidobactérias e estas não influenciaram nas características do produto;

- A análise de oxidação lipídica por TBARS, permitiu avaliar um comportamento diferenciado entre o controle, e os tratamentos T1 e T2. A pequena evolução da oxidação lipídica nos tratamentos T1 e T2 demonstrou que a linhagem de *Bifidobacterium lactis* auxiliou retardando a oxidação lipídica.

- Quanto à avaliação microbiológica de coliformes a 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Clostridium* sulfito redutor e *Salmonella* sp. foram obtidos resultados que permitiram classificar o Patê de Presunto como seguro do ponto de vista microbiológico;

- Na contagem de células viáveis de *Bifidobacterium lactis* foi observado que o tratamento T1 apresentou viabilidade como probiótico (contagem mínima de 10⁶ UFC) por 14 dias, enquanto que o tratamento T2 apresentou-se viável por todo o período de armazenamento avaliado, de 31 dias.

- A análise sensorial mostrou para o teste de aceitação, que não houve diferença significativa entre as amostras tratadas com *Bifidobacterium lactis* para a aceitação global do produto elaborado.

- Para o teste de intenção de compra, verificou-se que ambos os tratamentos foram aceitos pelos avaliadores recebendo o maior percentual das notas correspondendo às avaliações: Certamente comprariam (valor 5) e provavelmente comprariam (valor 4). Indicando desta forma, que para estes consumidores, o produto patê de presunto elaborado com a adição de *Bifidobacterium lactis* teria boa aceitação no mercado.

Considerando as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais avaliadas, permite-se dizer que o patê de presunto, elaborado com a inoculação do microrganismo probiótico *Bifidobacterium lactis* apresentou-se como um produto cárneo com características funcionais viável. O tratamento T2 (inoculado com 10^8 UFC.g⁻¹ de *Bifidobacterium lactis*) apresentou-se como um produto cárneo cozido com viabilidade para ser consumido como probiótico durante todo o período de armazenamento avaliado, portanto, podendo ser apresentado como uma alternativa e inovação de consumo para o setor cárneo.

SUGESTÕES

Sugere-se a realização de pesquisas futuras dando continuidade a este trabalho, avaliando diferentes formulações para o Patê de Presunto e a extensão do seu *shelf-life*, avaliar formas diferenciadas para a inoculação dos microrganismos probióticos; verificar a influência destes microrganismos na oxidação lipídica; além de se testar embalagens e diferentes maneiras de armazenamento deste produto.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Métodos de análise sensorial dos alimentos e bebidas**. NBR 12994 de Julho de 1993.

ALEXANDER, J. C. Biological effects due to changes in fats during heating. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, n. 10, p. 711-717, 1978.

ALEXANDER, J. W. Immunonutrition: The role of ω -3 fatty acids. **Nutrition**, v.4, n.7-8, p.627-633, 1998.

ANON, **Lebensmittelverordnung** vom. 26. Juni 1995, Stand am 7. Mai 2002 (LMV, SR 817.02). Eidgenössische Druck – und Materialzentrale, Ch-3003 Bern.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**. v.35, p. 171-176, 2002.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico estabelece os padrões microbiológicos em alimentos**. RDC nº 12 de 02 de Janeiro de 2001.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 17th ed., 2002.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**. 2 ed. Ed. UFV, Viçosa: p. 59-85, 1999.

ARIHARA, K.; ITOH, M. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium choride and sodium nitrite for meat fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 56, p. 227-230, 2000.

BAGGIO, S. R. **Óxidos de colesterol, colesterol, lipídeos totais e ácidos graxos em produtos cárneos processados**. 2004, 202f. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BARBOSA, F. H. F; SILVA, A. M.; DUARTE, R.; NICOLI, R. J. Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana de *Bifidobacterium bifidum* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 1, n.2, 2001.

BERRA, B.; MONTORFANO, G.; RIZZO, A. M. Omega-6 e omega-3: rationale per lo studio del loro rapporto. **Progress in Nutrition**, v.7, p.24-33, 2005.

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

BOTE, C. L.; OLIVARES, A.; FERNÁNDEZ, E.; RAMIREZ P.; REY, A. Estratégias genéticas y nutricionales en la modificación de la composición de la carne. In: **DERIVADOS CÁRNICOS FUNCIONALES: ESTRATÉGIAS Y PERSPECTIVAS**, 2005, Madrid. **Série Informes**. Madrid: Fundación Española de Nutrition – FEN, 2005. p. 55-64.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - **Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**. Resolução Nº 5, 13 de novembro de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Métodos analíticos oficiais para Análises Microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. Instrução normativa nº 62 de 26 de Agosto de 2003.

_____. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de patê** - Instrução Normativa nº 21 de 31 de Julho de 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regulamento Técnico: Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos**, Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 281-370, 2002.

CHANG, S. S.; PETERSON, R. J.; HO, C. T. Chemical reactions involved in the deep-fat frying of foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, n. 10, p. 718-727, 1978.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal Dairy Technology**. v. 51, n. 4, p. 123 – 136, 1998.

CHRISTIAN HANSEN. Method for coating probiotic bacteria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and Bifidobacteria in milk products made with nutritive cultures. 1999. 5 p. **[Procedimento Analítico]**.

CHRISTIAN HANSEN. Leches fermentadas, microorganismos probióticos e salud. **Notícia nº22**, 1997.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal** v.8, p.487-490, 1998.

COLMENERO, F. J. Estrategias tecnológicas de optimización de componentes para el desarrollo de productos cárnicos funcionales. In: DERIVADOS CÁRNICOS FUNCIONALES: ESTRATEGIAS Y PERSPECTIVAS, 2005, Madrid. **Série Informes**. Madrid: Fundación Española de Nutrición – FEN, 2005. p. 43-54.

CORRALES, A.; HENDERSON, M.; MORALES, I. Sobrevivência de microorganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* em helado batido. **Revista Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología**. v. 34, n. 2007.

DREHMER, A. M. F. **Quebra de peso das carcaças e estudo da vida de prateleira da carne suína**. 2005.115f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Tecnologia e Ciência dos Alimentos, UFSM, Santa Maria, 2005.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pâté. **Meat Science**, 2006.

FARBER, J. M.; McKELLAR, R. C.; ROSS, W. H. Modelling the effects of various parameters on the growth of *Listeria monocytogenes* on Liver pâté. **Food Microbiology**, v. 12, p. 447-453, 1995.

FRANKEL, E. N. **Trends Food Science & Technology**.v. 4, p. 220, 1993.

FULLER, R. History and development of probiotics. **Cristian Hansen**, Denmark, 1994.

GINÉS, J. M. F.; LÓPEZ, J. F.; BARBERÁ, E. S.; ALVAREZ, J. A. P. Meat Products as Functional Foods: A Review. **Journal of Food Science**. v. 70, n. 2, 2005.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, p. 139-157, 1999.

GONÇALVES, J. R.; SILVEIRA, E. T. F.; YAMADA, E. A. Considerações sobre a utilização de pré-mistura no processamento de embutidos cárneos emulsionados **Colet. Inst. Tecnol. Aliment.** v. 25, p. 1-7, 1995.

GUILLOT, F. L.; MALNOË, A.; STADLER, R. H. **J. Agric. Food Chem.** v. 44, p. 2503, 1996.

HALSTED, C. H. Dietary supplements and functional foods: 2 sides of a coin? **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 77, suppl., p. 1001S – 1003S, 2003.

HAMILTON, R. J.; ROSSELL, J. B.; HUDSON, B. J. F.; LÖLIGER, J. **Rancidity in Foods**. Ed. Applied Science Publishers LTD.; London, 1983, p. 1.

HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9 ed. , Williams & Wilkins , p. 787, 1994.

HOOVER, D. Bifidobacteria: activity and potential benefits. **Food Technology**, 47 (6): 120-124, 1993.

INTERNATIONAL FOODS INFORMATION COUNCIL, 2007. **Consumer attitudes toward Functional Foods/Foods for Health – Executive Summary**. Disponível em: <<http://ific.org/research/funcfoodsres07.cfm>>. Acesso em: 11 Março de 2009.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.** v.18, n.2, p. 299-313, 2004.

JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L.; RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S.; **In Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives**. Ed.; Marcel Dekker Inc.; New York 1996; p. 5.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. ed. **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p. 357 – 381.

KOSUGI, H.; KOJIMA, T.; KIKUGAWA, K. **Lipids**. v. 24, p. 873, 1989.

KUBOW, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. **Trends in Food Science and Technology**, v.1, p. 67-71, 1990.

LAHTINEN, S. J. L.; GUEIMONDE, M.; OUWEHAND, A. C.; REINIKAINEN, J. P.; SALMINEN, S. J. Comparison of four methods to enumerate probiotic Bifidobacteria in a fermented food product. **Food Microbiology**. v. 23. p. 571-577, 2005.

LAROIA, S.; MARTIN H. *Bifidobacterium* as possible dietary adjuncts cultured dairy products – a review. **Cultured Dairy Products Journal**. v.25, p. 18-22, 1990.

LEAHY, S. C.; HIGGINS, D. G.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. A review. **Journal of Applied Microbiology**, 98, p. 1303-1315, 2005.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trend in Food Science & Technology**, v.15, n.2, p. 67-78, 2004.

LORENTE, B. F.; SERRA, J. D. Alimentos Funcionais: Probióticos. **Acta Pediátrica Española**. v. 59, p. 150-155, 2001.

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

MACEDO, R. E. F.; PLANZER JR., S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, S.J.R. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva, **B.CEPPA**, Curitiba, v. 23, n.1, jan/jun. 2005.

MATTILA – SANDHOLM, T.; MYLLARIENEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**. v. 12, p. 173-182, 2002.

MEILE, L.; GWENAELLE, L. B.; THIERRY, A. *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**. p. 1-5, 2007.

MILLER, D. K.; GOMEZ-BASAURI, J. V.; SMITH, V. L.; KANNER, J.; MILLER, D. D. Dietary iron in swine rations affects nonheme iron and TBARS in pork skeletal muscles. **Journal of Food Science**. v. 59, p. 747–749, 1994.

MILLER, D. K.; SMITH, V. L.; KANNER, J.; MILLER, D. D.; LAWLESS, H. T. Lipid oxidation and warmed-over aroma in cooked ground pork from swine fed increasing levels of iron. **Journal of Food Science**. v.59, pp. 751–756, 1994.

MINOZZO, M. G.; WASZCZYNSKYJ, N.; BEIRÃO, L. H. Características físico-químicas do Patê de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), comparado a produtos similares comerciais. **Revista Alimentos e Nutrição**. v. 15, n. 2, p. 101-105, 2004.

MORRISSEY, P. A.; SHEEHY, P. J. A.; GALVIN, K.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J. Lipid Stability in Meat and Meat Products. **Meat Science**. n.49, p. 73–86, 1998.

NEWBURG, D. S.; CONCON, J. M. Malonaldehyde concentrations in food are affected by cooking conditions. **Journal of Food Science**, v. 45, n.6, p. 1681-1687, 1980.

NINESS, K. R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal Nutrition**. Bethesda, v. 129, suppl. 7, p. 1402S – 1406S, 1999.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

OLIVO, M.; SHIMOKOMAKI, M. Emulsões Cárneas. In:___**Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. Ed. Varela, 2006. cap. 12, p. 123-132.

ORDÓÑEZ, J. A. P.; *colaboradores*. Produtos Cárneos. In:___**Tecnologia de Alimentos, vol. 2**. ed. Artmed, 2005. cap. 10, p. 187-217.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de tba aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v.28, n.4, p. 655-663, 2005.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 82, pp. 279–289, 2002

PANIANGVAIT, P.; KING, A. J.; JONES, A. D.; GERMAN, B. G. Cholesterol oxides in foods of animal origin. **Journal of Food Science**, v.60, n. 6, p 1159-1174, 1995.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N.; SCHIMIDT, G. R. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid – C₁₈ method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 40, p. 2182-2185, 1992.

RAHARJO, S.; SOFOS, J. N. Methodology for measuring malonaldehyde as a product of lipid peroxidation in muscle tissues: A review. **Meat Science**, v. 35, n. 2, p. 145-169, 1993.

RHEE, K. S. Chemistry of meat flavor. In: MIN, D. B.; SMOUSE, T. H. (Org). **Flavor chemistry of lipid foods**. Champaign: AOAC, 1989. 462p.

RIBEIRO, D. Comunicação Pessoal. **ABIA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS**, 1997.

ROBERFROID, M. B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Journal Nutrition**. v. 129, suppl. 7, p. 1398S – 1401S, 1999.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J. M. Omega 3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 83, n. 3, p. 217-244, 1999.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 1, Jan./Mar., 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal Biotechnology**. v.84, p.197-215, 2000.

SAAVEDRA, J. M.; BAUMAN N. A.; OUNG I. *et al.* Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus Thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. **The Lancet**. v. 344, p. 1046 – 1049, 1994.

SANCHES-MUNIZZ, F. J. Nuevos Alimentos. Realidad y perspectivas de la carne y sus derivados como alimentos funcionales In: DERIVADOS CÁRNICOS FUNCIONALES: ESTRATÉGIAS Y PERSPECTIVAS, 2005, Madrid. **Série Informes**. Madrid: Fundación Española de Nutrición – FEN, 2005. p. 42-54.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotics bacteria. **International Dairy Journal**. v. 8, p.341-347, 1998.

SARANTÓPOULUS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, ÉRICA. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. São Paulo: CETEA, 2001. 213 p.

SCHIFFNER, E.; OPPEL, K.; LÖRTZING, D. **Elaboración casera de carne y embutidos**. Zaragoza:Acibia, 1996. p. 129-133.

SCHMELZER-NAGEL, Wolfgang. Patê: novos aspectos tecnológicos. **Revista Nacional da Carne**. v. 5, n. 243, p. 45-50, 1999.

SGHIR, A.; GRAMET, G.; SUAUI, A.; ROCHET, V.; POCHART, P.; DORE, J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization, **Appl. Environ. Microbiol.** v. 66, pp. 2263–2266, 2000.

SILVA, J. G.; MORAIS, H. A.; JUNQUEIRA, R. G.; OLIVEIRA, A. L. Avaliação da estabilidade e da qualidade do Patê de Presunto adicionado de globina bovina e de caseinato de sódio, como agente emulsionante. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 10-15, jan.-abr. 2003.

SILVA, J. G.; BARBOSA, C. M. S.; JUNQUEIRA, R. G.; OLIVEIRA, A. L.; SILVESTRE, M. P. C. Avaliação dos efeitos da incorporação da Globina Bovina e do Caseinato de Sódio no Patê de Presunto. **Brasilian Journal of Food Technology**. v. 13, p. 115-120, 2000.

SIMS, R. J.; FIORITI, J. A. **CRC Handbook of Food Additives**, 2nd edition, vol. II. Ed. CRC Press Inc. 1980; p. 13.

ST. ANGELO, A. J. **Crit. Rev. Food Science Nutrition.**, v. 36, p.175, 1996.

TAHRI, K.; GRILL, J.; SCHEINER, F. Involvement of trihidroxiconjugated bile salts in cholesterol assimilation by Bifidobacteria. **Current Microbiology**, 34:79-84, 1997.

TÁRRAGA, M. Saúde é foco entre produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**. n.378, p. 52-60.

TERATENAVAT, R.; HOOKER, N. Consumer Valuations and preference heterogeneity for a Novel Functional Food. **Journal of Food Science**. v. 71, n. 7, 2006.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Unisinos, 216p. 1998.

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacterium*. **Journal of Dairy Science**, v.86, p. 2288-2296, 2003.

URNAU, D. **Elaboração de produto cárneo probiótico a partir de microrganismos isolados de leites fermentados**. 2008, 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

VERMEIREN, L. D.; VANDEKINDEREN, U. R.; DEBEVERE, J. The sensory acceptability of cooked meat products treated a protective culture depends on glucose content and buffering capacity: A case study with *Lactobacillus sakei* 10A. **Meat Science**. v. 74, n. 3, p. 532 – 545. 2006.

VINDEROLA, C. G., REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G. R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 473-479, 1998.

WONG, J. W.; HASHIMOTO, K.; SHIBAMOTO, T. **J. Agric. Food Chem.** v. 43, p. 2707, 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Etapas de processamento do patê de presunto: adição da matéria-prima no *cutter* / trituração e emulsificação



Adição da matéria-prima no *cutter*



Matéria-prima triturada sendo emulsificada no *cutter*

APÊNDICE 2

Etapas de processamento do patê de presunto: adição dos ingredientes / mistura da massa cárnea



Adição dos Ingredientes



Etapa de mistura da massa cárnea

APÊNDICE 3

Etapas de processamento do patê de presunto: adição do corante a massa cárnea / inoculação de *Bifidobacterium lactis*



Massa Cárnea após adição do corante



Adição do inóculo ao patê de presunto

APÊNDICE 4

Crescimento de microrganismo probiótico - *Bifidobacterium lactis* inoculado no patê de presunto nas temperaturas de 40, 50 e 60°C

Temperatura de Inoculação (°C)	Concentração <i>Bifidobacterium lactis</i> inoculada / Crescimento (Log UFC/g. ⁻¹)		
	10 ⁶	10 ⁸	10 ¹⁰
40	7,2*	9,9	10,3
50	5,6	5,8	7,2
60	2,3	3,7	3,9

* Os valores de Log UFC/g.⁻¹ apresentados correspondem as médias das duplicatas

APÊNDICE 5

Ficha Avaliação Sensorial para Teste Afetivo de Aceitação e de Intenção de Compra

ANÁLISE SENSORIAL – PRODUTO PATÊ DE PRESUNTO

Nome _____ Data ___/___/___

Você esta recebendo uma amostra de Patê de Presunto, por favor, avalie a amostra de patê utilizando a escala abaixo indicando qual o seu grau de aceitação avaliando os atributos: cor, aroma, sabor e textura.

AMOSTRA 216

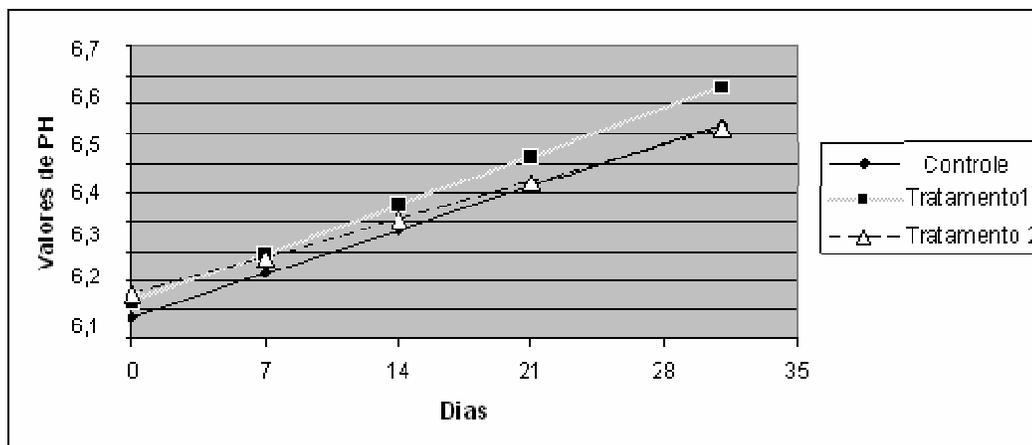
ESCALA	COR	AROMA	SABOR	TEXTURA
Desgostei muitíssimo				
Desgostei muito				
Desgostei regularmente				
Indiferente (não gostei nem desgostei)				
Gostei moderadamente				
Gostei muito				
Gostei muitíssimo				

Você compraria este produto:

- () Certamente eu compraria
- () Provavelmente eu compraria
- () Talvez eu compraria/ talvez não compraria
- () Provavelmente eu não compraria
- () Certamente eu não compraria

Comentários _____

O modelo de melhor ajuste para descrever o comportamento do pH para os três tratamentos foi o cúbico, conforme o observado logo abaixo.



Curvas de regressão ajustadas, conforme o modelo estimado, para cada tratamento.

APÊNDICE 7

Variável TBARS - análise de variância univariada em esquema de parcelas subdivididas no tempo

Análise de Variância em esquema de parcelas subdivididas no tempo e teste de esfericidade.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	Pr>F
Tratamento	2	0,0002290	0,00011452	24,15	<0,0001
Erro(a)	9	0,0000336	0,00000373		
Dias	4	0,0015642	0,00039106	82,47	<0,0001
Tratamento*Dias	8	0,0003135	0,00003918	8,26	<0,0001
Erro(b)	36	0,0001707	0,00000474		

 Teste de esfericidade: Critério de Mauchly=0,4132468
 Aproximação Qui-Quadrado=6,5541847
 Graus de liberdade= 9
Probabilidade >Qui-Quadrado = 0,6834

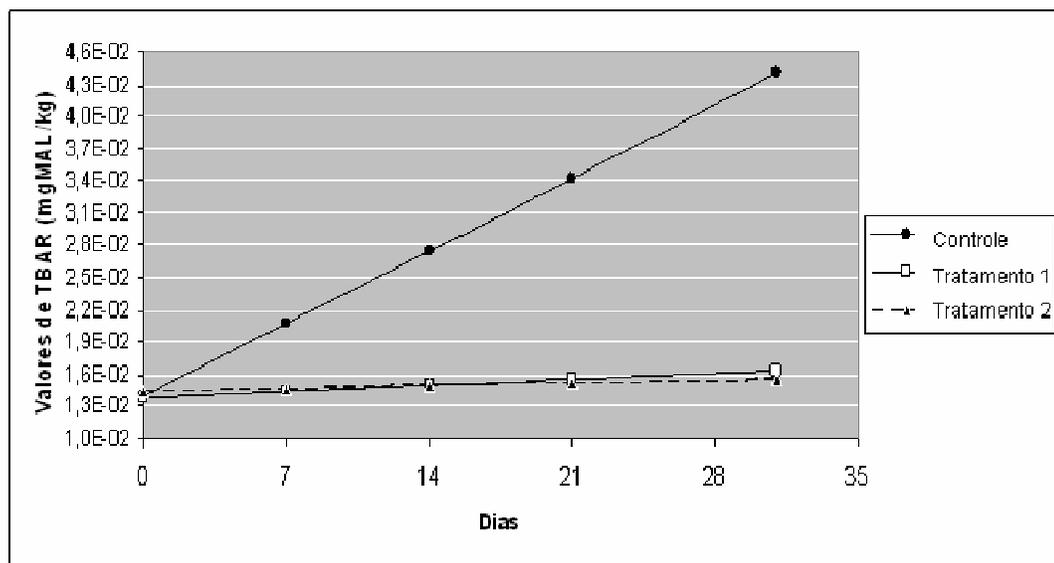
Para a variável TBARS também se verifica que a interação Tratamento*Dias foi significativa indicando um comportamento diferenciado dos tratamentos conforme o período avaliado sendo assim para estudar este comportamento estimou-se um modelo de regressão para cada tratamento.

Modelos de regressão ajustados para cada tratamento em função dos dias.

Parâmetros	Tratamentos					R ²	R ² -ajustado
	Testemunha (Controle)						
	valor	Erro Padrão	Valor - t	Pr> t			
intercepto	1,40E-02	1,53E-03	9,16	<0,0001			
dias	1,22E-03	2,32E-04	5,25	<0,0001	0,86		0,83
dias ²	-2,50E-04	7,00E-06	-3,5	0,0027			
----- Tratamento 1							
intercepto	1,39E-02	9,56E-04	14,57	<0,0001			
dias	6,06E-05	1,46E-04	0,42	0,6827	0,91		0,90
dias ²	1,51E-05	4,47E-06	3,38	0,0035			
----- Tratamento 2							
intercepto	1,44E-02	8,52E-04	16,9	<0,0001			
dias	2,37E-05	1,30E-04	0,18	0,8571	0,89		0,88
dias ²	1,32E-05	3,98E-06	3,31	0,0041			

Para a variável TBARS o modelo de melhor ajuste para descrever o comportamento desta variável em relação ao tempo foi o cúbico. Abaixo encontram-se representadas as curvas ajustada aos dados conforme o tratamento. Observa-se

que o tratamento testemunha obteve os maiores valores de TBAR e estes vão tendo um grande acréscimo à medida que os dias vão passando. Já para o tratamento T1 e T2 o comportamento é praticamente igual não havendo grandes acréscimos com os dias.



Curvas de regressão ajustadas, conforme o modelo estimado, para cada tratamento.