

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MICHELLE GALINDO DE OLIVEIRA

**BIOATIVIDADE DE QUITOSANA NA INIBIÇÃO DE CEPAS
PATOGENICAS EM HAMBÚRGUERES**

RECIFE

2016

MICHELLE GALINDO DE OLIVEIRA

**BIOATIVIDADE DE QUITOSANA NA INIBIÇÃO DE CEPAS
PATOGENICAS EM HAMBÚRGUERES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do
título de Doutor em Nutrição.

Orientador: Thayza Christina Montenegro Stamford

Co-orientador: Roberta de Albuquerque Bento

RECIFE

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48b Oliveira, Michelle Galindo de.
Bioatividade de quitosana na inibição de cepas patogênicas em hambúrgueres / Michelle Galindo de Oliveira. – 2016.
160 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Conservação de alimentos. 2. Ação antimicrobiana. 3. Polissacarídeo. 4. Produtos da carne. 5. Vida de prateleira. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-194)

MICHELLE GALINDO DE OLIVEIRA

BIOATIVIDADE DE QUITOSANA NA INIBIÇÃO DE CEPAS PATOGÊNICAS EM HAMBÚRGUERES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção
do título de Doutor em Nutrição.

Aprovada em 25/01/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Thayza Christina Montenegro Stamford

Prof^º Dr Nelson Justino Gomes Neto

Prof^ª Dr^ª Lúcia Raquel Ramos Berger

Prof^ª Dr^ª Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Prof^ª Dr^ª Samara Alvachian Cardoso Andrade

RECIFE, 2016

Aos amores da minha vida:

Meus pais Gilson e Fátima.

Minhas irmãs Andrezza, Vanessa e Juliana.

Meus pacotinhos lindos Gabriel, Heitor, Caio,
Vitor e Vinicius.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e discernimento a mim concedidos em todos os momentos de alegria e tristeza.

Aos meus pais, Gilson e Fátima por tudo que sou, tudo que fiz e tudo que farei. Por me ensinarem os valores que realmente valem a pena, pois o que levamos conosco é o que amamos e deixamos amar. Com eles aprendi de uma forma tão linda a sentir as pessoas com o coração, a amar com toda a dimensão que o amor possa tomar. Amo-os infinitamente. Painho e mainha obrigada por cuidarem tão docemente de mim.

Às minhas irmãs, Andrezza, Vanessa e Juliana por existirem na minha vida e serem “minhas” irmãs que amo incondicionalmente. Sendo meu porto seguro e os braços que sinto sempre ao meu redor. Agradeço por cada sorriso de felicidade, abraço de aconchego e beijos carinhosos.

Aos meus sobrinhos, Gabriel, Heitor, Caio, Vitor e Vinicius. Seus singelos gestos de ingenuidade me fizeram e fazem acreditar que coisas boas existem. Obrigada por bagunçarem tão alegremente minha vida.

Aos meus amados cunhados, Klébio, Tibério e Jomar, irmãos que não tive, pelo cuidado, amor e carinho a mim dedicados.

À Antônio Humberto por toda ajuda e ensinamentos a mim passados da melhor maneira possível e por torcer pela minha vitória sempre.

À eterna amiga irmã Silvana Trindade Low (Sil), por tudo... Companheira de todos os momentos. Nunca poderei retribuir sua dedicação a mim.

À amiga iluminada Roberta Bento, obrigada por existir na minha vida, obrigada por cada oração, cada palavra, cada gesto de amor.

Às minhas amigas lindas Wylla Tatiana, Cybelle Rolim, Juliana Oliveira, Luciana Orange e Vanessa Leal, por cada segundo de sua atenção e carinho. Vocês são muito especiais pra mim.

Às amigas fieis Priscilla Rolim, Vivianne Padilha pela torcida, apoio e amizade preciosa nos momentos pantanosos.

Ao meu doce e integro amigo Nelson Justino pela pessoa encantadora que me conquistou eternamente. Você é um anjo.

Às minhas amigas Silvana Arruda, Marisilda Ribeiro e Matilde Cesiana que iluminam meus dias e tornam o trabalho leve e divertido.

À fortaleza chamada Samara Alvachian por toda paciência. Sou eternamente grata pela sua amizade e ajuda na minha vida pessoal.

À princesinha Natalia Montenegro por todo o esforço pra mim ajudar. Você é um anjinho lindo.

À nova e inesperada amiga Thatiana Stamford. Obrigada por todos os ensinamentos e confiança a me depositada.

Aos meus amigos valiosos, Bruno e Sueli Sena. Vocês são exemplo de determinação.

À minha orientadora e amiga, Thayza Christina pela compreensão, orientações e ensinamentos no decorrer do meu trabalho. Aprendi muito com você.

À professora Tânia Stamford pelo exemplo de pesquisadora incansável que é.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Fernanda Luigi, Natália Melo, Bruna Mendonça e Carla Bismark por toda ajuda e incentivo durante os experimentos.

A todos que fazem o Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos Prof.^a Nonete Barbosa Guerra – LEAAL. Em especial a professora Silvana Salgado por cada sorriso, gesto de carinho e amizade, e Vivaldo Araújo pelo ser humano precioso que é.

Aos professores Thatiana Stamford, Samara Alvichian, Nelson Justino e Lúcia Raquel Berger por aceitarem compor a banca de defesa tão prontamente.

Às professoras Gláucia Lima e Margarida Angélica por todas as contribuições durante as qualificações.

Ao programa de pós-graduação em nutrição da UFPE por todo o apoio dado a este trabalho.

À Neci Nascimento por todo o seu carinho comigo.

Aos meus amados alunos por me ensinarem e estimularem a aprender cada dia mais.

A todos meus sinceros amigos que de perto ou de longe contribuíram cada um do seu jeitinho para tonar meus dias mais coloridos...

“Os sonhos são como deuses, quando não se acredita neles, deixam de existir”

Cazuza

RESUMO

Os produtos cárneos apresentam alto consumo mundial e devido as suas propriedades nutricionais constituem ambiente favorável para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. A indústria de alimentos vem tentando reduzir os níveis de aditivos químicos e investindo em pesquisa de compostos naturais que tenham ação conservante. A quitosana é um polímero natural que apresenta aplicações em alimentos, pois dentre suas várias propriedades destaca-se sua ação antimicrobiana. Este estudo teve como objetivo verificar a ação antimicrobiana da quitosana na inibição de cepas patogênicas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) em hambúrgueres elaborados, bem como acompanhar a vida de prateleira e aceitação sensorial deste produto formulado. Os testes para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da quitosana, foram realizados através da técnica de microdiluição. Os testes em matriz alimentar foram realizados em hambúrgueres infectados por *S. aureus* e *L. monocytogenes*, por meio da contagem de células viáveis nos intervalos de 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 30 dias. Ademais, no produto cárneo preparado, com e sem quitosana, foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas, sensorial mensalmente durante o período de 4 meses para verificação da vida de prateleira. O teste sensorial dos hambúrgueres elaborados, com e sem quitosana, foi avaliado através de uma escala hedônica. Observou-se que a quitosana apresentou efeito bactericida e bacteriostático para ambas bactérias, sendo CIM $2,5\text{mg.mL}^{-1}$ e CBM $5,0\text{mg.mL}^{-1}$. Nos hambúrgueres previamente infectados por cada micro-organismo, as concentrações de $2,5$ e $5,0\text{mg.mL}^{-1}$ de quitosana apresentaram efeito similar nos patógenos testados. Durante o armazenamento não ocorreram alterações prejudiciais às características sensoriais e microbiológicas devido à interação da quitosana com os demais constituintes dos hambúrgueres. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que a quitosana foi capaz de inibir o crescimento de cepas patogênicas em hambúrgueres. Hambúrgueres adicionados de quitosana apresentaram estabilidade durante 120 dias à -18°C . Dessa forma a quitosana pode ser considerada uma alternativa viável na preservação de alimentos, podendo ser utilizada como conservante natural em hambúrguer. Este estudo contribui de forma significativa não somente para a comunidade científica, mas também para as indústrias de produtos cárneos, uma vez que o importante achado da utilização de quitosana pode auxiliar no controle destes patógenos de maneira saudável, segura e saborosa, isto é, do ponto de vista nutricional, microbiológico e sensorial, respectivamente.

Palavras chaves: Conservação de Alimentos; Ação Antimicrobiana; Polissacarídeo; Produtos da Carne; Vida de Prateleira.

ABSTRACT

The meat products have high global consumption and because of its nutritional properties contribute to the development of pathogenic micro-organisms. The food industry has been trying to reduce levels of chemical additives and investing in research of natural compounds that have preservative action. Chitosan is a natural polymer with many applications in food, because among its various property stands out for its antimicrobial action. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of chitosan in inhibiting pathogenic strains (*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*) in elaborate burgers, and monitor its shelf life and check the sensory acceptance of the formulated product. Tests to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of chitosan were performed by broth microdilution technique. The tests were conducted in the food matrix into hamburger infected by *S. aureus* and *L. monocytogenes*, through the viable cell count in the ranges of 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 and 30 days. Besides in prepared meat product, with and without chitosan were carried out microbiological, physical-chemical, sensory monthly during the period of four months shelf life for verification. The sensory test of the elaborate hamburgers with and without chitosan was evaluated using a hedonic scale. It was observed that chitosan inhibited the growth of bacteria tested, with static and lished effect similar for both bacteria, MIC being 2,5mg.mL⁻¹ and 5,0mg.mL⁻¹ and CBM⁻¹. In burgers previously infected by each microorganism, concentrations of 2.5 and 1 5,0mg.mL-chitosan exhibited a similar effect on the tested pathogens. During storage there were no detrimental changes to the organoleptic and microbiological characteristics due to the interaction of chitosan with the other constituents of the burgers. From the results obtained it was observed that chitosan was able to inhibit the growth of pathogenic strains burgers. Hamburgers added chitosan remained stable for 120 days at -18° C. Thus chitosan can be considered a viable alternative in the preservation of foods and can be used as a natural preservative in hamburger. This study makes a significant contribution not only to the scientific community, but also for industries of meat products, since the important finding of the use of chitosan can help control these pathogens of healthy, safe and tasty way, that is, from the point nutritional, microbiological and sensory view, respectively.

Key words: food preservation, antimicrobial activity, biopolymer, meat products, shelf life.

LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química da quitina e quitosana.....	32
2	Espectro no infravermelho da quitosana sigma ®.....	49
3	Espectro de RMN ¹ H da quitosana sigma ®.....	51
4	Interferência da quitosana sobre a sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> em hambúrgueres armazenados à -18°C durante o período de 30 dias.....	58
5	Interferência da quitosana sobre a sobrevivência de <i>Staphylococcus aureus</i> em hambúrgueres armazenados à -18°C durante o período de 30 dias.....	59
6	Avaliação da cor instrumental de hambúrguer com e sem adição de gel de quitosana armazenado à -18°C por 120 dias.....	67
7	Avaliação da textura instrumental de hambúrguer com e sem adição de gel de quitosana.....	69
8	Avaliação da textura instrumental de hambúrguer com e sem adição de gel de quitosana armazenado à -18°C por 120 dias.....	69
9	Intenção de compra de hambúrgueres com e sem adição de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.....	73

LISTA DE TABELAS

1	Ingredientes e respectivas quantidades utilizadas na produção dos hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana.....	43
2	Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana sigma ®.....	49
3	Integração dos picos do espectro de RMN ¹ H da quitosana sigma ® para cálculo do grau de desacetilação.....	52
4	Percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, relação carbono/nitrogênio e o grau de desacetilação da quitosana sigma ®.....	53
5	Valores dos graus de desacetilação da quitosana sigma ® determinados por RMN ¹ H e análise elementar.....	53
6	Valor da viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica média da quitosana estudada.....	56
7	Análise físico-química de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.....	61
8	Valores de Aw de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.....	65
9	Valores de pH de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.....	66
10	Média das notas dos julgadores aos atributos sensoriais de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.....	70
11	Soma das ordens de preferência de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.....	74

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Alimentos Industrializados X Segurança Alimentar.....	18
2.2 Produtos Cárneos e Doenças Veiculadas por Alimentos.....	20
2.3 Hambúrguer à base de carne bovina.....	23
2.4 Incidência de <i>S. aureus</i> e <i>L. Monocytogenes</i> em produtos cárneos.....	24
2.5 Aditivos em alimentos.....	27
2.6 Quitosana na Conservação dos Alimentos.....	30
3. OBJETIVOS.....	37
4. MÉTODOS.....	39
4.1 Cepas microbianas e preparação do inóculo.....	39
4.2 Obtenção, caracterização e preparo da quitosana.....	39
4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima da quitosana	41
4.4 Produção dos Hambúrgueres.....	42
4.5 Interferência da quitosana sobre a sobrevivência microbiana em hambúrgueres.....	43
4.6 Avaliação da estabilidade de hambúrgueres adicionado de quitosana durante armazenamento.....	44
4.7 Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICES.....	98
Apêndice A: Ficha da Análise Sensorial.....	98
Apêndice B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	99
Apêndice C: Inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> in beef burger by chitosan.....	100
Apêndice D: Characterization and bioactivity of chitosan against food pathogenic bacteria in burgers.....	111
Apêndice E: Burger stability assessment of chitosan added during storage.....	132
ANEXO.....	158
Anexo A: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE.....	158

Apresentação

1. APRESENTAÇÃO

Na produção e industrialização de alimentos, inúmeros avanços vem ocorrendo, tanto no desenvolvimento tecnológico, como na melhoria das condições higiênico-sanitárias para a elaboração dos alimentos processados. Entretanto, apesar da evolução industrial, as Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs), ainda classificam-se entre os maiores problemas de saúde pública do mundo contemporâneo, fato que têm modificado o comportamento do consumidor, tornando-o mais exigente, o que requer maiores precauções pela indústria devido à competitividade (AKUTSU et al., 2005).

A elaboração de novos produtos através do processamento dos alimentos é de grande interesse para a indústria de alimentos, pois maximiza a vida de prateleira, preserva as características nutricionais dos produtos, e ainda acentua as características sensoriais desejáveis. Atualmente, um dos produtos de grande demanda industrial é a carne e o Brasil tem se mantido no ranking como um dos mais importantes produtores de carne bovina do mundo (9 milhões de toneladas/ano), o que tem estimulado a expansão deste tipo de mercado, e incorporado os produtos cárneos como parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores, com consumo "*per capita*" situado em torno de 41 kg/ano no Brasil (ABIEC, 2015).

O hambúrguer, produto cárneo industrializado, pode ser obtido da carne moída dos animais, com subsequente adição ou não de gordura e outros ingredientes, moldado através de processos tecnológicos, tendo como resultado final um produto com características organolépticas intrínsecas (BRASIL, 2000). O valor nutricional e a praticidade do hambúrguer combinam com o modo de vida dos que habitam os centros urbanos, o que o torna um alimento representativamente popular (ROMANELLI & CASERI & LOPES FILHO, 2002). Entretanto, um inconveniente é que na superfície deste produto, podem se desenvolver micro-organismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Clostridium* sulfito redutor a 46 °C, os quais podem ocasionar DVA.

Segundo alguns estudos (BRAGA et al., 2005; BLAIOTTA et al., 2004), dentre as três maiores causas de DVA de origem bacteriana do mundo, o agente patogênico que vem se destacando é *Staphylococcus aureus*, no qual encontra na carne e em seus derivados um dos principais veículos de contaminação. Outro micro-organismo de interesse é *Listeria*

monocytogenes, sendo várias as causas apontadas para a destacável ocorrência em produtos cárneos (BARROS et al., 2007; CRUZ et al., 2008). As hipóteses para tal incidência é decorrente das suas características psicrotrófica, resistência a agentes antimicrobianos como substâncias ácidas e alcalinas, além da capacidade de formação de biofilmes, principalmente em equipamentos (fatiadores; moedores) e no ambiente de processamento, conferindo assim proteção contra a ação de sanitizantes (BRANDÃO, 2011). Ademais, também estão relacionadas à presença do micro-organismo no ambiente intestinal dos animais e contaminação por pessoas envolvidas no trabalho em abatedouros (KASNOWSKI, 2004).

A polêmica em torno do uso dos conservantes químicos em alimentos ocorre devido à possível interação de tais substâncias com componentes dos alimentos, no processamento ou no metabolismo, que promovem, por sinergismo, a formação de componentes de maior toxicidade de ação carcinogênica, além de produzir vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa em geral, enrubescimento da face e extremidades, desconforto gastrointestinal, dor de cabeça, cianose, náusea, vômitos e dores abdominais. Assim, como tentativa de reduzir os níveis dos aditivos químicos, pesquisas buscam nos compostos alternativos um emprego mais adequado dos conservantes naturais, proporcionando maior qualidade de vida para os consumidores (MELO FILHO & BISCONTINI & ANDRADE, 2004).

As técnicas de preservação mais modernas e naturais têm demonstrado um interesse pela segurança microbiológica através do uso de produtos naturais, dentre vários antimicrobianos, a quitosana têm obtido grande destaque por atender às perspectivas de mercado, e por apresentar características particulares como bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, capacidade de formar gel e filme, capacidade de quelação, e capacidade adsortiva. (BOSTAN & MAHAN, 2011; DARMADJI & IZUMIMOTO, 1994).

A quitosana é um polissacarídeo encontrado na natureza, obtida por processo de baixo custo, produzida através dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos (AIDER, 2010). Exoesqueletos de crustáceos, principalmente de camarões, constituem a fonte comercial tradicional para a obtenção de quitina e quitosana. O conteúdo de quitina nos crustáceos varia com a espécie, estando o rendimento entre 2 a 12% da massa corpórea total. A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina utilizando NaOH 50% e altas temperaturas (THARANATHAN & KITTUR, 2003).

Diante da abundância e atoxicidade da quitosana, os seus potenciais de aplicação têm sido cada vez mais ampliados, indo desde o uso para a terapia genética, até a indústria alimentícia, como base na fabricação de suplementos nutricionais, emulsificantes, conservantes, fibras em biscoitos dietéticos, estabilizantes em alimentos em conservas, clarificantes de bebidas, dentre outros (SHAHIDI et al., 2002; BORDERÍAS & SÁNCHEZ-ALONZO & PÉREZ-MATEOS, 2005; BORGOGNI et al., 2006; LI et al., 2007).

A quitosana vem sendo utilizada na indústria de alimentos nos Estados Unidos, Alemanha e Japão, sendo reportado neste último, como agente conservante em: macarrão, molho de soja, sardinha, entre outros; todavia, ainda são escassos os dados quanto às condições de processamento e formulação (RODRÍGUEZ & CENTURIÓN & AGULLÓ, 2002). Na aplicação em carne e subprodutos, algumas pesquisas já foram realizadas, em bacalhau (SHAHIDI et al., 2002), carne de cordeiro (KANATT et al., 2004), salsicha (DAMIAN, 2005), mortadela (CHI et al., 2006) e em patê de carne (BENTO, 2011).

Uma das principais utilizações da quitosana está relacionada à sua propriedade antimicrobiana, que têm como responsável a natureza policatiônica da molécula, a qual interage com a superfície da bactéria. A eficiência da quitosana como antimicrobiano é comprovada sob diversos micro-organismos, dentre eles, os contaminantes em produtos cárneos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (LI et al., 2007) e *Listeria monocytogenes* (COMA et al., 2002).

Contudo, tendo em vista os riscos impostos por *L. monocytogenes* e *S. aureus* em produtos cárneos, associados ao risco dos aditivos artificiais, surge a necessidade de alternativas naturais em combinação a outros métodos de conservação agindo como obstáculo. Dessa forma, a aplicabilidade da quitosana na indústria, apresenta uma série de funções desejáveis, uma vez que permite a manutenção da qualidade microbiológica e química, além de que sua produção estimula o efetivo aproveitamento de subprodutos (carapaça de crustáceo), proporcionando um importante impacto social e ambiental.

Diante do exposto a presente pesquisa tem por objetivo verificar a bioatividade da quitosana na inibição de cepas patogênicas em hambúrgueres.

Revisão da Literatura

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ALIMENTOS INDUSTRIALIZADOS X SEGURANÇA ALIMENTAR

A busca da receita da longevidade tem movido as pessoas pela procura de um estilo de vida saudável, onde um dos maiores questionamentos se dá em torno da alimentação. Esta cada vez mais frequente a preocupação do consumidor com os benefícios e prejuízos que um alimento pode causar à saúde. A facilidade do acesso à informação tem contribuído neste contexto. O consumidor se preocupa com o valor nutritivo do alimento, com sua origem, com os aditivos presentes e com uma possível ação benéfica à saúde (DEVLIEGHIERE & VERMEULEN & DEBEVERE, 2004; FAI & STAMFORD & STAMFORD, 2008).

Na produção e industrialização de alimentos, inúmeros avanços ocorreram nos últimos anos, tanto no desenvolvimento tecnológico, como nas condições higiênico-sanitárias. Entretanto, apesar da evolução tecnológica, as doenças transmissíveis por alimentos (DVAs), ainda classificam-se entre os maiores problemas de saúde pública do mundo contemporâneo, fato que têm modificado o comportamento do consumidor, tornando-o mais exigente, o que requer maiores precauções pela indústria devido à alta competitividade (DEVLIEGHIERE & VERMEULEN & DEBEVERE, 2004; FAI & STAMFORD & STAMFORD, 2008; WELKER et al., 2010).

É crescente o número de consumidores que tem exigido da indústria de alimentos a adoção de uma política decrescente de uso de aditivos químicos para obtenção dos seus objetivos voltados para a segurança alimentar, bem como para o retardo das ações microbianas de caráter deteriorantes, as quais conduzem o alimento a um estado impróprio para o consumo. Sendo assim, a indústria alimentícia procura atender regras gerais que se baseiam em prolongar o período de armazenamento dos alimentos, fazendo com que estes permaneçam adequados para o consumo e gerem lucros para os fabricantes (FELLOWS, 2006).

A garantia do direito de todos ao acesso ao alimento de boa qualidade, tem sido amplamente discutida pelos setores públicos e privados, especialmente no aspecto nutricional e em relação à inocuidade dos alimentos. Quando o maior enfoque na aquisição de alimentos pelo consumidor está relacionado à ausência de contaminantes, sejam de natureza química, física ou biológica, utiliza-se o termo alimento seguro, do inglês “food safety”. Enquanto, os perigos

físicos são os mais comumente identificados (pêlos, fragmentos de metal, osso, etc) pelos consumidores, os perigos químicos e microbiológicos, por sua vez, impõem o maior risco, do ponto de vista da saúde pública (ALMEIDA & SILVA, 1998).

Nesse contexto, o consumidor procura se informar sobre os produtos consumidos, e em contrapartida as indústrias alimentícias cada vez mais se preocupam em informar a respeito das condições que um determinado alimento foi produzido. Em decorrência disso, a identificação dos fatores determinantes da qualidade sanitária de qualquer produto requer a aplicação e investigação de métodos que favoreçam o reconhecimento das medidas de controle que eliminem os fatores de risco em questão relacionados principalmente aos processos tecnológicos. A presença e detecção de cepas de micro-organismos patogênicos resistentes a antimicrobianos artificiais têm despertado grande preocupação no setor de saúde pública e no campo da Ciência e Tecnologia de Alimentos (FAI & STAMFORD & STAMFORD, 2008; BENTO et al., 2009).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), as DVAs constituirão provavelmente o maior problema de saúde no mundo contemporâneo (AKUTSU et al., 2005). As DVAs desempenham importante papel socioeconômico, pois ocasionam custos à saúde pública e barreiras na exportação de produtos ao mercado internacional, além de perda da credibilidade da unidade produtora (RODRÍGUEZ & BERTIN & ASSIS, 2004).

Com os fatos relacionados à falta de segurança dos alimentos ocorridos nas últimas décadas, o atributo "segurança do alimento" tornou-se ainda mais valorizado, especialmente para carnes. No entanto, nem todos os atributos podem ser avaliados pelos consumidores no momento da compra. O nível de contaminação por microrganismos e/ou resíduos químicos, por exemplo, só poderão ser determinados por meio de testes laboratoriais mais sofisticados (TALAMINI & PEDROZO & SILVA, 2005).

Diante da necessidade de controlar a proliferação microbiana, as indústrias utilizam quantidades de aditivos artificiais acima do permitido por lei, podendo com isso, ocasionar problemas à saúde humana, devido à possibilidade de originarem compostos tóxicos de ação carcinogênica (EICHHOLZER & GUTZWILLER, 1998; HILL, 1999; RAUHA et al., 2000; MELO FILHO & BISCONTINI & ANDRADE, 2004).

Como tentativa de reduzir os níveis dos aditivos químicos, pesquisas buscam um emprego mais adequado dos conservantes, demonstrando um interesse pela segurança microbiológica

através do uso de compostos naturais, pois participam como ingredientes de inúmeros alimentos, tornando-os mais saborosos, digestivos e agindo como potentes agentes antimicrobianos. Proporcionando maior qualidade de vida para os consumidores e maximizando a vida de prateleira (LANCIOTTI et al., 2004; BENTO et al., 2009).

Com a intenção de aumentar a vida de prateleira dos produtos alimentícios e contornar o problema da deterioração causada por micro-organismos, a indústria alimentícia utiliza aditivos artificiais do tipo conservantes, para contornar essa problemática. Porém os consumidores tem se tornado mais exigentes, preferindo alimentos cada vez mais naturais tendendo a evitar alimentos que apresentem em sua composição aditivos químicos devido aos problemas de toxicidade que podem apresentar (RAUHA et al., 2000).

Sendo assim, como alternativa para a aplicação de métodos de conservação cada vez mais seguros, com baixos níveis de aditivos, bem como possuindo aceitável qualidade sensorial, surge o uso de antimicrobianos naturais, que podem ter nos produtos cárneos um emprego de grande interesse tanto para a indústria, como também para os consumidores.

2.2 PRODUTOS CÁRNEOS E DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS

Os produtos cárneos processados ou preparados são aqueles cujas características originais da carne fresca foram alteradas através de tratamentos físicos e/ou químicos. O processamento da carne fresca visa à elaboração de novos produtos e, por inibir a ação de enzimas microbianas de caráter degradativo, prolonga a vida de prateleira, além de apresentar inúmeras vantagens, como não alterar de forma significativa as características nutricionais, e influenciar de forma positiva as características organolépticas do produto conferindo cor e sabor próprios de cada processo (ROMANELLI & CASERI & LOPES FILHO, 2002).

O mercado de produtos cárneos tem apresentado significativa expansão e alta competitividade. O Brasil é um dos mais importantes produtores de carne bovina do mundo, (6,3 milhões de toneladas/ano), e tem consumo "per capita" situado em 41 kg/ano (ABIEC, 2015). Além da utilização da própria carne no preparo de alimentos, o consumo de vários subprodutos da carne tornou-se parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores em todo o mundo. Entretanto, o consumo de tais produtos tem sido altamente discutido em virtude

do uso abusivo de aditivos alimentares que podem apresentar potencial prejuízo a saúde dos consumidores (MELO FILHO & BISCONTINI & ANDRADE, 2004).

Carnes e produtos cárneos dispõem de grande susceptibilidade às contaminações bacterianas, pois apresentam condições ideais para o desenvolvimento de micro-organismos, devido à fatores intrínsecos e extrínsecos da carne, como atividade de água, pH, composição química, temperatura e umidade, podendo alterar a microbiota natural e contribuir para a instalação e proliferação de patógenos, gerando sérios riscos à saúde do consumidor (PIERSON & CORLETT, 1992; FRANCO & LANDGRAF, 1996; GARCIA, 1996; CASSIN et al., 1998).

Cassarín (2005) afirma que dentre os produtos de origem cárnea os hambúrgueres merecem considerada atenção, diante do aumento expressivo de seu consumo, pois são fabricados com matéria prima que pode apresentar contaminação microbiana e em seu processo produtivo está propício à contaminação patogênica devido às falhas mecânicas de higiene operacional.

A Resolução RDC nº 12 define DVA aquela causada pela ingestão de um alimento contaminado, por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico. Entende-se por produto alterado ou deteriorado o que apresenta alteração(ões) e ou deterioração(ões) físicas, químicas e ou organolépticas, em decorrência da ação de microrganismo e ou por reações químicas e ou físicas (MARIANO, 2004; BRASIL, 2001).

No Brasil, segundo dados do Sistema de Vigilância Epidemiológica, no período de 1999 a 2008, de um total de 3.984 surtos investigados, 23 % tiveram como principal alimento envolvido preparações a base de ovos crus e/ou mal cozidos, 17% ocorreram devido ao consumo de alimentos mistos, 12% devido ao consumo de carnes vermelhas, 11% por sobremesas, 9% água, 7% leite e derivados e em 21% dos casos não foi possível identificar o alimento envolvido (BRASIL, 2008).

Os hambúrgueres comercializados nem sempre são legalmente regulamentados e submetidos à procedimentos de fiscalização o que tem contribuído para elevar consideravelmente a frequência de toxinfecções alimentares em nível mundial (GERMANO et al., 2000; OMS, 2002; FATTORI et al., 2005).

A natureza e patogenicidade do agente etiológico combinados com a idade e susceptibilidade individual podem causar à saúde humana danos bastante variáveis, tornando as

DVAs um dos maiores contribuintes com os elevados custos econômicos e sociais, sendo um grande problema de saúde pública, tanto no Brasil como nos demais países (BUZBY, 2002; UNNEVEHR & ROBERTS & CUSTER, 2004; WELKER et al., 2010).

As camadas menos favorecidas da população geralmente são as mais afetadas devido a hábitos culturais e por terem acesso à alimentos de má qualidade devido ao preço mais baixo. Os grupos de crianças, idosos, gestantes e indivíduos imunodebilitados fazem parte do grupo de risco por apresentar o sistema imunológico incompleto e/ou deficiente. Ingestões de pequenos números de patógenos podem ser viáveis para causar uma DVA. É importante considerar ainda que tais patologias podem manifestar-se de forma diferentes, como mais acentuada, causando sérias complicações ou até mesmo a morte (BUZBY, 2002; MCCABE-SELLERS & BEATTIE, 2004; UNNEVEHR & ROBERTS & CUSTER, 2004).

Segundo dados do Sistema de Informações, do Ministério da Saúde, ocorreram mais de 3.400.000 internações por DVA no Brasil, de 1999 a 2004, com uma média de cerca de 570 mil casos por ano. De acordo com o Sistema de Informação sobre Mortalidade, de 1999 a 2002, ocorreram 25.281 óbitos por DVA no Brasil, com uma média de 6.320 óbitos por ano (CARMO et al., 2005). As doenças transmitidas por alimentos ocasionam elevados custos à saúde pública, perda da credibilidade da unidade produtora e representam uma barreira na exportação de produtos frente ao mercado internacional (RODRÍGUEZ & BERTIN & ASSIS, 2004).

Durante o processamento tecnológico de elaboração de hambúrgueres, todas as etapas da cadeia produtiva como a pesagem, moagem, mistura, congelamento e embalagem envolvem operações de risco no que diz respeito aos perigos microbiológicos, tais como, contaminação, multiplicação e resistência microbiana (OLIVEIRA et al., 1999).

Segundo Jay (2005) produtos à base de carne bovina moída que estejam sob condições higiênicas insatisfatórias possui uma microbiota composta, predominantemente, por bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas* e por Gram-positivas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus*. Dentre diversas cepas contaminantes, as mais comuns nestes alimentos são *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus* e *Salmonella*, e, eventualmente, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus* (LINDQVIST et al., 2001; ZANSKY et al., 2002; SILVA & SANTOS & FERREIRA., 2006; JAY, 2005; FORTUNA & FRANCO, 2005).

Dessa forma, diante das condições intrínsecas e extrínsecas da carne propiciar à colonização e proliferação de microrganismos patogênicos, favorecendo a perda da qualidade dos produtos cárneos, as indústrias necessitam utilizar artifícios que contornem essa problemática, fazendo com que conservantes artificiais sejam acrescentados à carne e produtos cárneos com o intuito de aumento da vida de prateleira.

2.3 HAMBÚRGUER À BASE DE CARNE BOVINA

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer define hambúrguer como, produto cárneo industrializado, obtido da carne moída dos animais de açougue, podendo ser adicionado ou não de ingredientes e tecido adiposo, moldado através de processos tecnológicos adequados, tendo como resultado final um produto com características organolépticas intrínsecas (BRASIL, 2000).

O hambúrguer possui nutrientes que alimentam e saciam a fome rapidamente, portanto, o seu valor nutricional e praticidade combinam com o modo de vida nos centros urbanos, o que o torna um alimento representativamente popular (LIMA & OLIVEIRA, 2005; NASCIMENTO & OLIVEIRA & NASCIMENTO, 2005). Entretanto, um inconveniente é que na superfície deste produto, geralmente se desenvolvem micro-organismos patogênicos, como Coliforme a 45 °C, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* e *Clostridium* (LINDQVIST et al., 2001; SILVA & SANTOS & FERREIRA., 2006; JAY, 2005; FORTUNA & FRANCO, 2005; SHINOHARA et al., 2008).

O consumo de hambúrguer tem aumentado de maneira exponencial, sendo vendido mais de 100 bilhões de hambúrgueres em todo mundo, numa proporção de 75 hambúrgueres por segundo (SPENCER & FRANK & MCINTOSH, 2005). De acordo com Caye et al., (2009) a Comissão do *Codex Alimentarius*, fórum americano de estudos da alimentação, previu que o hambúrguer será uma das preparações mais difundidas no mundo até 2020, superando a fama da pizza.

As mudanças nos hábitos alimentares da população, motivadas especialmente pelos processos de urbanização, industrialização e crescente profissionalização das mulheres, acarreta em diminuição do tempo disponível para o preparo de alimentos da família e também o tempo de consumo. Isso tem favorecido o consumo de produtos industrializados e a busca por alimentos

preparados fora do domicílio, que sejam rápidas para o consumo e baratas, como os hambúrgueres de carne bovina. Assim, os hambúrgueres tornam-se uma opção crescente entre a população, lanchonetes e redes de restaurantes fast-food, contribuindo desse modo para que o consumo nacional de hambúrguer seja superior ao de outros produtos cárneos congelados (LEVRÈ & VALENTINI & CHIAVERINI, 2000; TAVARES & SERAFINI, 2003; FATTORI et al., 2005; LIMA & OLIVEIRA, 2005; NASCIMENTO & OLIVEIRA & NASCIMENTO, 2005; ALVES & UENO, 2010).

A crescente demanda por produtos industrializados, tem cooperado com o aumento dos riscos das DVAs, frente à aceleração nos processos metabólicos, condições sanitárias deficientes, durante as etapas de abate dos animais, cozimento inadequado, armazenamento inapropriado e a falta de higiene dos utensílios, equipamentos e dos manipuladores, constituindo um risco à saúde dos consumidores devido à contaminação (FATTORI et al., 2005; MCCORMICK et al., 2005; MARCHI, 2006; SAMUEL et al., 2007).

2.4 INCIDÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* EM PRODUTOS CÁRNEOS.

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus são bactérias Gram-positivas com formato semelhante a cacho de uva. A temperatura de crescimento ideal esta na faixa de 7°C a 47,8°C, no entanto, as produções de suas toxinas só acontecem numa faixa de temperatura entre 10°C e 46°C, com temperatura ótima de 40°C a 45°C. O pH ideal de crescimento é de 4 a 9,8, e em alimentos a faixa ótima é de 6 a 7 com atividade de água de 0,86. *S. aureus* é capaz de crescer bem em concentrações de cloreto de sódio (NaCl) de 7 a 10% e algumas estirpes podem crescer em concentrações de 20% (JAY, 2005).

A contaminação dos alimentos por *S. aureus* é mais comum em relação a outros micro-organismos, isso se deve as particularidades de seu habitat, que torna a sua presença bastante comum na natureza, sendo transmitido ao alimento através do contato deste com os manipuladores, pois fazem parte da flora natural do homem, e por meio de falhas higiênic-

sanitárias durante o processo (IARA & FURLANETTO & CAMPOS, 1980; CASTRO & IARIA., 1984; JERÔNIMO et al., 2011).

A intoxicação estafilocócica se deve devido à alta ingestão de alimentos que contenham as enterotoxinas estafilocócicas termotolerantes. Uma dose $\leq 1,0$ micrograma (μg) de enterotoxina já produz sintomas de intoxicação estafilocócica em alimentos contaminados, mas esse nível de toxina é tipicamente alcançado somente quando a população de *S. aureus* é maior que 10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/ g (NASCIMENTO, 2011). São reconhecidos 18 tipos de enterotoxinas (A, B, C_{1,2,3}, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, U), dos quais os tipos A, B e C foram identificados em amostras de hambúrgueres (JARRAUD et al., 2001; SORIANO et al., 2002; LE LOIR & BARON & GAUTIER, 2003; BORGES et al., 2008)

Anualmente são estimados em torno de 185.060 casos de toxinoses alimentares, 1.753 hospitalizações e dois óbitos por *S. aureus*, na Inglaterra e país de Gales (ADAK et al., 2005; MEAD et al., 1999). No Brasil entre 1993 a 2004, foram evidenciados surtos de toxinoses causados por este patógeno, tendo a carne fresca e o hambúrguer bovinos confirmados como veículos nos EUA e na Europa (CÂMARA, 2002; LINDQVIST et al., 2001; ADAK et al., 2005; OLSEN et al., 2000).

A grande quantidade de toxinas que são produzidas por este micro-organismo contribui para a sua patogenicidade, intensificada pela habilidade de invadir o corpo e danificar os tecidos. O choque tóxico pode ser causado pela sua toxina, produzindo sintomas de febre alta, vômitos e infecção grave, podendo, às vezes levar a morte. Muitas vezes a sua enterotoxina é responsável pelo quadro de intoxicação alimentar que também gera um quadro de vômitos e náuseas depois de ingeridas (MARIANO, 2004).

2.4.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes pode ser isolada do solo, água, silagem, plantas e outras fontes. Essa bactéria, mesmo não sendo esporulada, apresenta destacável resistência e suporta os efeitos deletérios do congelamento, desidratação, acidez e calor, além de poder se desenvolver em ambientes com baixas tensões de oxigênio, devido à sua característica microaerófila (SAKATE et al., 2003). Sua ampla distribuição ambiental é favorecida não somente pela capacidade de se desenvolver entre 0 e 44 °C, embora sua faixa ótima seja entre 30 e 37 °C, mas também por

tolerar valores extremos de pH (5 – 9), além de baixa atividade de água e concentrações de NaCl superiores a 10 % (CATÃO & CEBALLOS, 2001).

O primeiro surto de listeriose causado por ingestão de produtos cárneos contaminados, envolveu um tipo de patê importado pelo Reino Unido tendo como consequência 366 doentes e 63 mortes (MCLAUHLIN, 1996). O primeiro relato de listeriose nos Estados Unidos foi de um caso esporádico relacionado ao consumo de embutido de carne de peru, por uma paciente com câncer (MMWR, 1989).

Uma variedade de problemas clínicos em decorrência da ação de *L. monocytogenes* tem sido relatada, porém a maior parte das complicações clínicas em humanos tem sido septicemia, meningite neonatal, “septicemia e meningite em imunodeprimidos”, além de “septicemia e doença gripal inespecífica em mulheres sadias durante a gestação”, as quais podem infectar o feto (DEDIOL et al., 2002). Durante os surtos, a mortalidade pode atingir 40% dos acometidos pela infecção, de modo que nos casos de meningite, essa taxa pode atingir 70% e nas septicemias 50% (GERMANO & GERMANO, 2001).

A adoção de padrões microbiológicos com exigência de ausência de *L. monocytogenes* em alimentos por parte de diversos países visa assegurar um produto isento de risco para o consumidor, pois embora uma única célula deste microrganismo, provavelmente, não seja suficiente para causar listeriose, sua capacidade de multiplicação durante a estocagem de alimentos, mesmo sob refrigeração, faz com que sua presença no alimento coloque em risco a saúde dos consumidores mais susceptíveis como gestantes, crianças e imunodeprimidos (CATÃO & CEBALLOS, 2001).

Nos Estados Unidos a Food and Drug Administration (FDA) (FDA, 2005) estabeleceu a norma de “tolerância zero” para presença de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo, sendo seguida pelo *United States Department of Agriculture* (USDA). No Brasil, apesar de não existir surtos de listeriose documentados, tendo como causa ingestão de alimentos, pesquisas já demonstraram o isolamento de *L. monocytogenes* em carne e produtos cárneos no território brasileiro (BARBALHO et al., 2005; KASNOWSKI, 2004). Entretanto, é necessário se colocar que os dados reais podem estar sendo subestimado, uma vez que a legislação brasileira (BRASIL, 2001) não prevê limites de tolerância para presença do microrganismo em carnes e produtos cárneos.

Várias são as causas apontadas para a destacável ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos. Uma das hipóteses é que a incidência poderia estar relacionada à presença do micro-organismo no ambiente intestinal dos animais, sem que ocorra a manifestação de sintomatologia clínica, facilitando, desta forma, que toda a carcaça possa ser contaminada durante as operações envolvidas no abate e evisceração do animal (QUINN, 2005).

Kasnowski (2004) cita a contaminação por pessoas envolvidas no trabalho em abatedouros, sendo constatado que 10 a 30 % eram portadores assintomáticos de *L. monocytogenes*, e também que veterinários de campo apresentavam listeriose cutânea adquirida pela manipulação de produtos de aborto infectados.

Alguns autores (BENKERROUM et al., 2005; MARTÍN et al., 2004) relatam que a facilidade do gênero *Listeria* em multiplicar-se nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos e sob baixas temperaturas o torna uma ameaça à indústria de alimentos. O fator apontado que auxilia a proliferação de *Listeria* na planta de processamento, é o crescimento de biofilmes, que podem conferir uma proteção contra a ação de desinfetantes com conseqüente manutenção do micro-organismo no ambiente e em equipamentos como fatiadores, moedores e embutideiras que são considerados de difícil higienização (BERESFORD & ANDREW & SHAMA, 2001). Além disso, estudos apontam que a situação pode ser agravada, pois a microbiota autóctone da carne não interfere no crescimento de *Listeria* sp., uma vez que esse gênero foi detectado mesmo nas amostras de carne e produtos cárneos, e em amostras ambientais e de superfície de equipamentos que apresentaram altos níveis de contaminação por aeróbios mesófilos e coliformes (BARROS et al., 2007).

Mead et al. (2006) abordaram a ocorrência de um surto com produtos cárneos processados, envolvendo 108 pessoas contaminadas e 14 mortes, onde foi confirmada a presença de *L. monocytogenes* como agente contaminante.

2.5 ADITIVOS EM ALIMENTOS

O uso de aditivos alimentares no Brasil é norteado pelo Ministério da Saúde, e regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aditivo alimentar é considerado qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, porém, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou

sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento (PORTARIA, Nº540, 1997).

A Portaria nº 540 (1997) classifica os aditivos químicos quanto à função, sendo os agentes conservantes classificados como substâncias que possuem a finalidade de impossibilitar ou atrasar a deterioração dos alimentos por ação microbiana ou enzimática (FAI & STAMFOR & STAMFORD, 2008). Sais de cura, como nitrato e nitrito de sódio e de potássio, são largamente utilizados como aditivos na conservação de produtos cárneos. Os sais de nitrito, além de inibirem a deterioração microbiana, são fixadores de cor e agentes de cura (HIRSCHBRUCH et al., 1999). A polêmica em torno do uso destes conservantes em alimentos ocorre principalmente em virtude da possibilidade de originarem compostos tóxicos de ação carcinogênica; devido a possível interação de tais substâncias com componentes dos alimentos, no processamento ou no metabolismo, que promovem, por sinergismo, a formação de componentes de maior toxicidade, ou, por antagonismo, substâncias que podem reduzir sua toxicidade (MELO FILHO & BISCONTINI & ANDRADE, 2004). Dessa forma, é imprescindível estabelecer medidas preventivas substanciais para efetivar o controle de qualidade e a vigilância sanitária objetivando minimizar os efeitos tóxicos causados pela adição de aditivos.

Ao analisar a dose necessária de um aditivo como nitrito a ser adicionada a um alimento, verifica-se que sua concentração dependerá da finalidade, sendo que seu emprego em produtos cárneos varia entre 30 e 50 ppm para o desenvolvimento de cor, entre 20 e 40 ppm para desenvolvimento de aroma, entre 80 e 150 ppm para o efeito conservante, e entre níveis de 20 e 50 ppm para o efeito antioxidante (LÜCKE, 2000). É válido salientar, que o alto nível desse aditivo tem como foco principal a conservação do alimento, uma vez que para a reestruturação da cor e aroma, são necessários no máximo 50 ppm.

Pesquisa realizada por Melo & Biscontine & Andrade (2004) aponta que produtos derivados de carne fabricados no Brasil apresentam, na maioria das vezes, níveis de nitrito e nitrato acima do permitido pela legislação. Tal achado tem sido atribuído a uma possível tentativa de prevenção da proliferação de microrganismo nestes produtos, visto que as altas temperaturas nos países de clima tropical somado a alta umidade, favorecem o crescimento microbiano.

Grandes quantidades desses sais, presentes nos alimentos, acima do que é permitido pela lei, pode acarretar sérios danos à saúde, devido a possibilidade de formação de efeitos tóxicos

agudos e crônicos. O nitrito, quando em excesso, age sobre a hemoglobina originando metahemoglobina, impedindo que a hemoglobina exerça normalmente a sua função. Além disso, o nitrito juntamente com aminas e amidas presentes no meio podem originar nitrosaminas e nitrosamidas, substâncias que possuem um efeito carcinogênico, mutagênico e teratogênico (EICHHOLZER & GUTZWILLER, 1998; HILL, 1999).

O nitrito possui um efeito bem mais tóxico, comparado ao nitrato. Além da formação da metahemoglobina produz vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa. Uma grama é considerada uma dose letal para indivíduos adultos, doses mais baixas produzem sintomas de rubor da face e extremidades, desconforto gastrointestinal e dor de cabeça. Em doses tóxicas um pouco mais elevadas observam-se cianose, náusea, vômitos, dores abdominais e colapso (SGARBIERI, 1987).

A utilização de aditivos químicos na matriz alimentar é uma das práticas mais discutidas e polêmicas. Os resultados de estudos apontando seus aspectos negativos e positivos relacionados à toxicidade de muitas dessas substâncias, gerando controvérsias. Dessa forma a indústria alimentícia adota uma nova postura com o crescimento de uma política decrescente de uso de aditivos químicos e estimulação de medidas eficientes e menos prejudiciais a saúde na preservação de produtos industrializados, como a utilização de antimicrobianos naturais (FAI & STAMFORD & STAMFORD, 2008).

O aumento na procura por antimicrobianos naturais, que apresentem uma ação sinérgica ao dos conservantes químicos para o emprego em produtos alimentícios, tem sido difundido desde os anos 80, uma vez que os aditivos químicos do tipo conservante estão sendo gradativamente restringidos devido a sua atividade carcinogênica e teratogênica (RAUHA et al., 2000; MOREIRA et al., 2005)

Diante das crescentes mudanças no processamento industrial e exigência do consumidor por alimentos mais naturais, com uma vida útil prolongada, que seja mantida a qualidade nutricional e sensorial, pesquisas impulsionam novas técnicas de preservação, como biopreservação e produtos antimicrobianos naturais (DEVLIEGHIERE & VERMEULEN & DEBEVERE, 2004; FAI & STAMFORD & STAMFORD, 2008). O uso dos conservantes naturais ganha força à medida que métodos mais seguros de conservação de alimentos, através de aditivos naturais e não tóxicos, vem sendo estudados para serem aplicados em substituição aos aditivos artificiais, pois baixos níveis de aditivos químicos combinado com uma boa qualidade

sensorial podem ter nos produtos cárneos um emprego de grande interesse tanto para a indústria, como também para os consumidores. A vantagem é que estes além de manter a qualidade dos alimentos, também inibem o crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos e proporcionam a segurança microbiologia exigida pelos consumidores e pela legislação de alimentos (LANCIOTTI et al., 2004; BENTO et al., 2009).

Dentre os antimicrobianos naturais, a quitosana e o óleo essencial de orégano vêm sendo estudado em modelos cárneos, uma vez que possuem um amplo espectro bactericida sob microrganismos patogênicos contaminantes da carne (CHI & ZIVANOVIC & PENJIELD, 2006; FAI & STAMFORD & STAMFORD, 2008; BENTO et al., 2011).

2.6 QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

As aplicações e a produção industrial da quitosana foram iniciadas a partir de 1970. No Japão, a produção de quitosana cresceu 37% ao ano entre 1978 e 1983 (CRAVEIRO & CRAVEIRO & QUEIROZ, 1999), onde pesquisas da época apontavam para uma grande variedade de aplicações da quitina e da quitosana devido à sua versatilidade biológica (CAMPOS-TAKAKI, 2005).

A quitosana é um polissacarídeo encontrado abundantemente na natureza, atóxico, obtida por processo de baixo custo, de grande interesse ambiental (biodegradável), produzida através dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos (BORDERÍAS & SÁNCHEZ-ALONZO & PÉREZ-MATEOS, 2005; LI et al., 2007).

Possui uma estrutura molecular semelhante, quimicamente, a celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais no C2 do anel glicopiranosídico (AZEVEDO *et al.*, 2007). A quitosana é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, que constitui os exoesqueletos de insetos e crustáceos e que ocorre naturalmente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (MATHUR & NARANG, 1990; ROBERTS, 1992; KAFETZOULOS & MARTINOV & BOURIOTIS, 1993; ASSIS & LEONI, 2003).

Exoesqueletos de crustáceos constituem a fonte tradicional para obtenção de quitina e quitosana. O conteúdo de quitina nos crustáceos varia com a espécie, estando o rendimento entre 2 a 12 % da massa corpórea total, e de 13 a 42 % na casca. A quitosana é obtida pela deacetilação da quitina utilizando NaOH 50 %, e temperatura em torno de 110 °C (SYNOWIECHI & AL-

KHATEEB, 2003; THARANATHAN & KITTUR, 2003). Existem várias limitações em relação à viabilidade do processo de obtenção da quitina e quitosana proveniente de crustáceos, tais como: a adaptação ao clima, sazonalidade, locais de confinamento, processamento em larga escala associado com a conversão química de quitina em quitosana, e contaminação residual de proteínas presentes na carapaça de crustáceos que podem causar reação alérgica (FRANCO et al., 2005; AMORIM et al., 2005).

A utilização de massa micelial de fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana tem demonstrado grandes vantagens, a citar: extração simultânea de quitina e quitosana, independência dos fatores de sazonalidade, produção em larga escala e maior grau de pureza (AMORIM et al., 2000; AMORIM et al., 2006; STAMFORD et al., 2007). A quantidade destes polissacarídeos extraídos da biomassa varia com a espécie de fungo e com as condições de cultivo utilizadas. Geralmente, fungos da Classe Zygomycetes apresentam maior quantidade de quitina e quitosana em sua parede celular (FRANCO et al., 2005; AMORIM et al., 2006; STAMFORD et al., 2007).

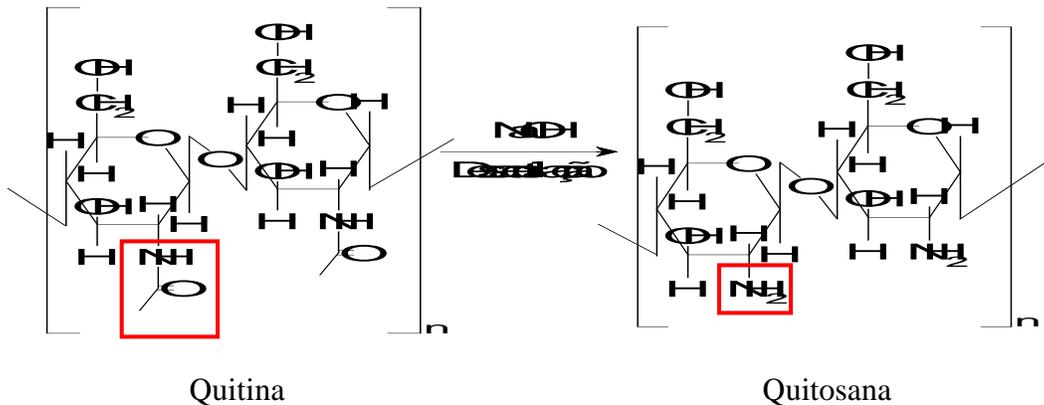
Várias pesquisas utilizando fungos como fonte alternativa de quitina e quitosana relatam rendimentos iguais ou superiores, destes polímeros, aos obtidos quando utilizadas fontes tradicionais (ANDRADE et al., 2003; AMORIM et al., 2005; FAI et al., 2011). Alguns estudos têm estabelecido métodos de otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana a partir de massa micelial de fungos da Ordem Mucorales (AMORIM et al., 2000; FRANCO et al., 2005; SILVA et al., 2006; STAMFORD et al., 2007, FAI et al., 2011).

Quitosana é encontrada naturalmente na parede celular de fungos, principalmente da Ordem Mucorales. Usualmente a quitosana é obtida através da desacetilação da quitina em meio alcalino, podendo o grupo N-acetil sofrer vários graus de desacetilação. O processo de conversão da quitina em quitosana deve ser realizado de forma adequada para garantir a obtenção de quitosana com alto grau de pureza, isenta de contaminantes como proteínas, endotoxinas e metais tóxicos. O polímero obtido deve ser caracterizado quanto ao grau de acetilação e massa molar, uma vez que tais características podem influenciar na degradabilidade e na hidrólise do polissacarídeo (COSTA-SILVA & SANTOS & FERREIRA, 2006; PEDRO et al., 2009). De acordo com o grau médio de acetilação (GA) pode-se obter quitosanas com propriedades físico-químicas diferenciadas com relação aos parâmetros de solubilidade, pKa e viscosidade (FRANCO et al., 2005; STAMFORD-ARNAUD & STAMFORD, 2010). É difícil a obtenção

de quitosana com alto grau de desacetilação, pois na medida em que este aumenta, a possibilidade de degradação do polímero também aumenta (COSTA-SILVA & SANTOS & FERREIRA, 2006).

Quitina e quitosana são copolímeros constituídos por unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina e *D*-glicosamina em proporções variáveis, as unidades de *N*-acetil-*D*-glicosamina predominantes na estrutura da quitina e a unidade *D*-glicosamina na quitosana conforme demonstrado na figura abaixo (KUBOTA et al., 2000).

Figura 1: Estrutura química da quitina e quitosana



As cadeias estruturais da quitosana ligam-se por meio do hidrogênio e podem diferenciar-se em três diferentes estruturas automórficas (α , β e γ), de acordo com a polaridade adquirida pelas cadeias de açúcar, sendo assim, conhecida por apresentarem polimorfismo (WINTEROWD & SANDFORD, 1995). Acredita-se, que as três estruturas polimórficas da quitosana estejam relacionadas com diferentes funções no organismo. A quitosana α forma ligação de hidrogênio intermolecular forte, enquanto a quitosana β é caracterizada por efeitos intermoleculares mais fracos (LIMA, 2008).

O potencial de aplicação da quitosana é multidimensional, as propriedades singulares da quitosana fazem com que esta seja bastante versátil quanto à sua aplicabilidade na área de alimentos, pois oferece um amplo espectro de aplicações, por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico (BENTO et al., 2009; AZEVEDO et al., 2007).

A eficiência da quitosana como antimicrobiano é comprovada sob diversos micro-organismos como *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis* (CHUNG et al., 2004), *S. aureus*, *E. coli* (ZHENG & ZHU, 2003; LI et al., 2007), *L. monocytogenes* (COMA et al., 2002), *S. entérica*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* (YADAV & BHISE, 2004), *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* (COSTA et al., 2010), *Sacharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida sp.*, *Rhodotorul sp.* (RHOADES & ROLLER, 2000; SAGOO & BOARD & ROLLER, 2002) dentre eles, os contaminantes em produtos cárneos, *S. aureus*, *E. coli* (LI et al., 2007) e *L. monocytogenes* (COMA et al., 2002). Uma das principais utilizações da quitosana está relacionada à sua propriedade antimicrobiana, que têm como responsável a natureza policatiônica da molécula, a qual interage com região superficial da bactéria.

A atividade antimicrobiana é uma das características que distinguem quitina e quitosana dos demais polissacarídeos. A atividade antimicrobiana da quitosana, de acordo com estudos mais recentes, está intimamente relacionada às propriedades físico-químicas do polímero, bem como às características da membrana do micro-organismo, pois são capazes de formar complexos polieletrólíticos, seus grupos amínicos protonados se ligam seletivamente à superfície celular carregada negativamente dos micro-organismos, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e, conseqüente, inibição microbiana (YADAV & BHISE, 2004; AVADI et al., 2004; TSAI & HWANG, 2004; SILVA et al., 2006; FAI & STAMFORD & STAMFORD, 2008).

Dependendo do tipo de alimento, a quitosana pode ser adicionada diretamente à matriz alimentar ou ser previamente diluída em solução ácida. Alguns estudos revelam, ainda, que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas das soluções, concentração utilizada e tempo de exposição, além das características inerentes à parede celular do micro-organismo em questão (COSTA SILVA & SANTOS & FERREIRA, 2006).

O tratamento com quitosana, tem se mostrado promissor no controle de doenças em pós-colheita de frutos (EL GHAOUTH et al., 1997; JIANG & LI, 2001), por apresentar atividade contra vários patógenos (JIANG & LI, 2001; BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003; EL GHAOUTH et al., 1991; ROMANAZZI & NIGRO & IPPOLITO, 2002; ROMANAZZI & NIGRO & IPPOLITO, 2003). Outra utilidade para a quitosana é o uso como um revestimento

antimicrobiano constituído de amido de mandioca adicionado de quitosana, apresentando assim resultado satisfatório no controle da microbiota presente no alho minimamente processado, visto que o crescimento de bactérias psicotróficas, fungos filamentosos e leveduras apresentou uma redução considerável durante 20 dias de estocagem (BOTREL, 2007).

Altieri et al. (2005) estudando a eficiência antibacteriana da quitosana em queijo mozzarella mantido sob temperatura de refrigeração, constataram que a quitosana inibiu o crescimento de micro-organismos do grupo coliforme e de *Pseudomonas* sp. Inferiram ainda, que a presença deste polissacarídeo não afetou a viabilidade e crescimento das bactérias ácidoláticas, ao contrário, observou-se um sutil estímulo com relação à sua multiplicação, de forma a não comprometer a funcionalidade tecnológica que esta classe de micro-organismos exerce sobre este produto. Assim o uso de quitosana seria uma opção vantajosa para estender a vida de prateleira deste alimento em termos tecnológicos e econômicos.

Na aplicação em carne e subprodutos, algumas pesquisas já foram realizadas, em bacalhau (SHAHIDI et al., 2002), carne de cordeiro (KANATT & CHANDER & SHARMA, 2004), salsicha (DAMIAN, 2005), mortadela (CHI & ZIVANOVIC & PENJIELD, 2006), e recentemente em patê de carne (BENTO et al., 2011). Chi & Zivanovic & Penjield (2006) apontou em seu trabalho, o efeito combinado de filmes de quitosana enriquecidos com o óleo essencial de orégano, incorporadas em fatias de mortadela armazenada a 10°C/5 dias, observando-se uma redução do número de células bacterianas de aproximadamente 4 ciclos logarítmicos, comparada com um redução de 1 a 3 ciclos logarítmicos quando aplicado somente o filme de quitosana, constatando ainda que este tipo de processo foi bem aceito em termos sensoriais.

Estudo com quitosana apontam como uma substância benéfica e segura para o consumo humano. Apresenta uma toxicidade menor do que a glicose ou sacarose. Em mamíferos a dose letal de glicose é da ordem de 8 a 12 gramas enquanto que 18 gramas de quitosana por quilograma de massa corporal não apresenta qualquer sinal de toxicidade ou mortalidade (CRAVEIRO & CRAVEIRO & QUEIROZ, 1999; YADAV & BHISE, 2004). Entretanto, como qualquer outra substância, se utilizada de forma inadequada ou em excesso pode ser nociva ao organismo (QUIN et al., 2006).

O objetivo da indústria alimentícia é proporcionar um prolongado período de validade dos alimentos, onde permaneça adequado para o consumo, aumentando a variedade de alimentos

viáveis para uma dieta saudável que forneça nutrientes necessários para a manutenção da saúde e gere lucros para os fabricantes (FELLOWS, 2006). Sendo assim, entende-se que a quitosana pode ser considerada uma opção promissora como conservante natural, haja vista a atual tendência adotada pela indústria de alimentos de uma política decrescente do uso de aditivos químicos, impulsionada pelo reflexo da incerteza de estudos negativos e positivos relacionados à toxicidade de muitas dessas substâncias químicas (BENTO et al., 2009).

Por razões de saúde pública, os processos de preservação de alimentos são determinados primeiramente pelo controle do desenvolvimento microbiano. Contudo, outros fatores devem ser controlados tais como a ocorrência de reações químicas e enzimáticas que comprometem a qualidade sensorial do produto (KANATT & CHANDER & SHARMA, 2004).

Desta forma a quitosana tem se mostrado um antimicrobiano que vem atendendo as perspectivas do mercado de alimentos (BORDERÍAS & SÁNCHEZ-ALONZO & PÉREZ-MATEOS, 2005; LI et al., 2007).

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a bioatividade da quitosana na inibição de cepas patogênicas em hambúrgueres.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I- Caracterizar físico-quimicamente a quitosana utilizada;
- II- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da quitosana sobre cepas de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*;
- III- Avaliar a interferência da quitosana (CIM e CBM) sobre a sobrevivência de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em hambúrgueres bovino, comparando com conservante comercial;
- IV- Verificar as características de qualidade (análises microbiológicas, físico-químicas e sensorial) de hambúrguer bovino adicionado de quitosana durante o armazenamento.

Métodos

4. MÉTODOS

4.1 CEPAS MICROBIANAS e PREPARAÇÃO DO INÓCULO

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizadas cepas padrões de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7664) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), as quais foram cedidas pelo Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, UFPE (Recife, Pernambuco, Brasil).

Os inóculos das cepas utilizadas foram obtidos por meio da preparação de suspensões de tais cepas em solução salina (NaCl a 0.85% p/v) estéril a partir de culturas *overnight* cultivadas em ágar Brain Heart Infusion (BHI) inclinado a 37°C por 18 horas. Tais suspensões foram padronizadas de acordo com a turbidez, pela escala McFarland correspondendo a 0.5 da escala, aproximadamente 5×10^9 Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL). O inóculo também foi padronizado através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530nm, com densidade óptica de 0,135.

4.2 OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DA QUITOSANA

A quitosana de médio peso molar da Sigma-Aldrich®, oriunda de carapaça de crustáceo, foi diluída em ácido acético 1%, tendo como concentração final $20 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. O gel de quitosana obtido teve seu pH ajustado para 5,8, utilizando hidróxido de sódio 1N.

Diversas técnicas foram realizadas para a caracterização da quitosana. As características estruturais da quitosana foram observadas por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. O grau de desacetilação foi determinado utilizando duas técnicas: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e análise elementar. A massa molar foi estimada através de medida de viscosidade.

As análises para caracterização da quitosana foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

4.2.1 Caracterização estrutural

-Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

O espectro no infravermelho da quitosana foi obtido em um espectrofotômetro com transformada de Fourier da Bruker, modelo IF66, na região entre 4.000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . Aproximadamente 1,5mg de quitosana foi seca em estufa a vácuo durante 15hs a 60°C . Em seguida, foi adicionado 100mg de KBr e a mistura homogeneizada em almofariz de ágata. As pastilhas de KBr foram preparadas e deixadas na estufa a vácuo a 110°C durante 20hs. Portanto, o espectro do pó da quitosana foi obtido utilizando pastilha de KBr como suporte (Signini & Campana Filho, 1998).

4.2.2 Grau de desacetilação

-Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos segundo metodologia descrita por Signini & Campana-Filho (2000). O equipamento utilizado foi o da Varian Unity Plus em 300 MHz. A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 10mg de cada quitosana em D_2O contendo 1% de HCl (37%), durante 24 hs formando uma solução viscosa. Uma alíquota dessa solução foi colocada em um tubo de 5mm de diâmetro para a análise a 50°C , com tempo de relaxação de 6 segundos e pulso de 90° .

-Análise Elementar

A análise elementar da quitosana foi obtida no equipamento Analisador Elementar modelo EA 1110 da Carlo Erba Instruments.

4.2.3 Massa molar

-Medida de Viscosidade

O peso molar foi determinado por viscosidade. As medidas de viscosidade foram realizadas utilizando um capilar de vidro tipo Cannon-Fenske (dinterno= $1,01\text{mm}$) termostaticado a $(25 \pm 0,01)^{\circ}\text{C}$, em um viscosímetro AVS-350 da Schott-Geräte. Para a determinação da

viscosidade intrínseca, $[\eta]$, foi preparada solução de quitosana (utilizando tampão de ácido clorídrico como solvente) com concentrações variando de 0,1 a 1,0mg/mL. Os tempos de escoamento foram determinados em segundos. Foram feitas três medidas de cada amostra e calculada a média.

4.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DA QUITOSANA

Para determinar as concentrações mínimas bacteriostáticas e mínimas bactericidas do gel de quitosana para *L.monocytogenes* e *S. aureus* foi realizado o teste de microdiluição seriada em meio BHI usando microplacas de 96 poços. Foram testadas concentrações do gel de quitosana variando de 0 a 1200 μ g/mL.

As microplacas foram preparadas de forma que cada compartimento tivesse um volume final de 100 μ L, com proporções variadas do meio de cultura e da substância teste, atingindo ao final, diferentes concentrações do produto teste (0 a 1200 μ g/mL). Para o controle de esterilidade foram adicionados 100 μ L do meio; para o controle de crescimento 80 μ L do meio. A todos os orifícios foram adicionados 20 μ L do inoculo microbiano, com exceção do controle de esterilidade. O ensaio foi realizado em quadruplicata, dois para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo uso da resazurina, e dois para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Após o preparo dos poços contendo meio de cultura, substância teste e inoculo microbiano, as microplacas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Terminado o período de incubação, foram adicionados 30 μ L de resazurina em dois orifícios de cada tratamento e no controle. As colunas restantes foram utilizadas para a determinação da CBM.

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO et al., 2002). Logo, a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano enquanto que as variações de rosa e roxo são indicadoras da presença de células viáveis para crescimento. Após 1 hora foi feita a análise da mudança de cor.

Para a determinação da CBM foram retiradas alíquotas, dos poços, anterior e posterior ao referente a CIM e incubadas em placa de Petri contendo meio agar BHI, sem quitosana, a 37°C por 48 horas. Foi considerada CBM como sendo a concentração a partir da qual não foi observado crescimento microbiano após cultivo.

4.4 PRODUÇÃO DOS HAMBÚRGUERES

Para realização das análises, foram elaborados 4 tipos de amostras. Hambúguer Controle (C), hambúguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana (Q_{2.5}), hambúguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana (Q_{5.0}) e hambúguer comercial (H). Para elaboração das amostras C, Q_{2.5} e Q_{5.0}, a carne foi adquirida em frigorífico na Cidade de Recife, refrigerada, sendo acondicionada em recipientes térmicos e levada ao laboratório. Para elaboração da amostra H, foram adquiridos hambúrgueres comerciais em supermercado local.

A produção dos hambúrgueres (C, Q_{2.5} e Q_{5.0}) foi realizada em sala asséptica, bancadas e instrumentos foram devidamente higienizados. Na carne (patinho), foram retiradas as aparas e excessos de gordura com o auxílio de faca, cortada em cubos e triturada em multiprocessador industrial. Após obtenção da carne moída, a mesma recebeu a adição dos ingredientes e foi misturada até a obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, as amostras foram adicionadas de gel de quitosana, exceto a amostra controle. Para obtenção das diluições do gel de quitosana a 2,5 e 5mg.mL⁻¹, utilizou-se a seguinte fórmula: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, onde C_1 foi a concentração inicial do gel de quitosana, V_1 o volume inicial do gel de quitosana, C_2 a concentração final do gel de quitosana e V_2 o volume final do hambúguer. Em seguida as amostras foram porcionadas. Para análise da interferência da quitosana sobre a curva de morte microbiana foi porcionado 10g de cada amostra em recipientes de vidro estéreis e adicionado o inóculo a ser testado. Para avaliação da estabilidade do hambúguer adicionado de gel de quitosana durante o armazenamento, foram moldados hambúrgueres com 40g. Todas as amostras foram armazenadas à -18°C. A tabela 1 mostra os ingredientes de cada formulação.

Tabela 1: Ingredientes e respectivas quantidades utilizadas na produção dos hambúrgueres com e sem gel de quitosana.

MATÉRIA-PRIMA	FQ _{2,5} *	FQ _{5,0} **	FC***
Carne bovina	100g	100g	100g
Coentro	5g	5g	5g
Pimenta do reino	0,01g	0,01g	0,01g
Açúcar	3g	3g	3g
Cebola	5g	5g	5g
Sal	1,5g	1,5g	1,5g
Farinha de trigo	10g	10g	10g
Óleo	-	-	5 ml
Gel de Quitosana	12,5ml	25ml	-

*FQ_{2,5} - Formulação de hambúrguer com gel de quitosana na concentração de 2,5mg.ml⁻¹

**FQ_{5,0} - Formulação de hambúrguer com gel de quitosana na concentração de 5mg.ml⁻¹

***FC - Formulação de hambúrguer Controle

4.5 INTERFERÊNCIA DA QUITOSANA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DE *L. monocytogenes* e *S. aureus* EM HAMBÚRGUER

Amostras de hambúrgueres foram preparadas conforme descrito no item 4.4 e acrescidos ou não de quitosana. Hambúrgueres sem adição do antimicrobiano foram utilizados como controle negativo e hambúrgueres comerciais foram utilizados como controle positivo por possuírem aditivos químicos. As amostras foram então separadas em recipientes de vidro estéreis, sendo adicionado 1mL do inóculo de *L. monocytogenes* ou *S. aureus* e em seguida foram armazenadas à -18° C. Nos tempos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 e 30 dias de armazenamento, quatro

recipientes (C, Q_{2.5}, Q_{5.0} e H) foram retirados (duplicata) para a realização da contagem de *L. monocytogenes* ou *S. aureus*. Para tal, 10g de cada amostra foi diluída (1:10 p/v) em solução salina (0,85% p/v) estéril, homogeneizada por 5 minutos e diluída seriadamente (10^{-2} a 10^{-8}) em solução salina (0,85% p/v) estéril. Em seguida, uma alíquota de 100µL de cada diluição foi uniformemente inoculada em placas de Petri estéreis contendo ágar seletivo para *S. aureus* (ágar Baird Parker acrescido de emulsão de gema de ovo e solução de telurito de potássio 1%) ou *L. monocytogenes* (ágar Oxford acrescido de suplemento para listeria). Os microorganismos foram incubados a 35°C - 37°C por 48 horas, sendo os resultados da contagem bacteriana expressos em Log₁₀.

4.6 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DO HAMBÚRGUER ADICIONADO DE QUITOSANA DURANTE O ARMAZENAMENTO

Para análise da vida de prateleira foram preparadas as seguintes amostras: Hambúrguer Controle sem adição do gel de quitosana (C), Hambúrguer com de 2,5 mg.mL⁻¹ de gel de quitosana (Q_{2.5}), Hambúrguer com 5 mg.mL⁻¹ de gel de quitosana (Q_{5.0}) e hambúrguer comercial (H).

Foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas e análise sensorial mensalmente durante o período de 4 meses. A cada 30 dias foram realizadas primeiramente as análises microbiológicas e em seguida as demais análises. Os hambúrgueres foram descongelados em refrigeração para a realização das análises.

4.6.1 Análises microbiológicas

Foram realizadas análises de Coliformes a 45 °C/g, Estafilococcus coagulase positiva /g, Clostridium Sulfito redutor a 46°C/g, Salmonella sp/25g, em cumprimento a legislação em vigor (BRASIL, 2001).

4.6.2 *Análise físico-química*

Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas dos hambúrgueres: Atividade de água instrumental aparelho (Decagon CX-2), pH, Umidade determinada por gravimetria em estufa a 105°C até peso constante da amostra (AOAC, 2002); Resíduo mineral fixo (cinzas) obtido mediante carbonização em chama e calcinação em mufla a 550°C até peso constante (AOAC, 1996); o teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet (AOAC, 963.15-31.4.02); Proteínas determinadas pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) e rancidez (Adolfo Lutz, 2001). Os carboidratos calculados por diferença.

A cor instrumental foi determinada utilizando um espectrofotômetro de reflectância (CR-400, Konica Minolta Sensing, Japão) com sistema CIE Lab que consiste em três componentes de cores: (L*) luminosidade, que varia de 0 (preto) a 100 (branco), (a*), que varia de verde (negativo) a vermelha (positivo) e (b*), que varia de azul (negativo) a amarela (positivo) (CIE, 2004). O ajuste do equipamento foi realizado previamente de acordo com as instruções do fabricante, e as aferições foram realizadas no centro do hambúrguer, em duplicata e ângulo observador de 10° foi o utilizado e com o iluminante D65.

Foram realizadas análises de textura instrumental (texturomêtro TA-XT2 Texture Technologies Corp) utilizando-se Análise de perfil de textura (TPA), com velocidade de 0,3 mm/s, compressão de 50% da altura do hambúrguer, tempo entre as duas compressões de 1,0s e probe cilíndrico de 1,27cm de diâmetro. As análises foram realizadas em triplicata. Foram avaliados os seguintes parâmetros de: dureza, força máxima requerida para compressão da amostra (N); elasticidade, habilidade da amostra em recuperar sua forma original depois que a força de compressão foi removida (adimensional); mastigabilidade, força requerida para mastigar a amostra (N).

4.6.4 *Análise sensorial dos produtos*

Foram recrutados 100 consumidores de hambúrgueres não treinados. Através de uma ficha de avaliação (APÊNDICE A) foi solicitado que indicassem em escala hedônica de 9 pontos o seu julgamento em relação à aceitação do produto, atribuindo nota 9 para gostei extremamente e 1 para desgostei extremamente (Minim, 2013), além do teste de ordenação para avaliar preferência e intenção de compra. Para preparação da amostra, os hambúrgueres foram descongelados sob refrigeração (4°C), fritos em óleo de soja a 180°C por aproximadamente 8

minutos, sendo o excesso de óleo retirado com o auxílio de papel toalha. Na avaliação dos produtos, as amostras com gel de quitosana (2,5 e 5mg/mL) e sem gel de quitosana, foram expostas de forma mais homogênea possível, servidas aos provadores em cabines individuais iluminadas com luz branca, à temperatura de 24°C, em pratos descartáveis, aleatoriamente codificadas com três dígitos, sendo intervaladas com copo de água para o enxágüe do resíduo da amostra anterior, bolacha para limpeza do paladar e pó de café para neutralização do odor, de forma que fosse possível o provador expressar as características sensoriais reais encontradas nos diferentes produtos.

4.6.5 *Considerações éticas*

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Pernambuco, estando o mesmo aprovado através do Registro CEP 1.285.277 (ANEXO A). A participação dos voluntários na pesquisa foi voluntária e condicionada a leitura e assinatura de um Termo de Consentimento Livre Esclarecido (APÊNDICE B), conforme a Resolução 466/12 da CONEP.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (One Way Analysis of Variance – ANOVA, seguida do Teste de Duncan), para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos aplicados. Para o tratamento estatístico utilizou-se o software statistic for Windows 7.0.

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A apresentação dos resultados foi dividida em quatro tópicos que serão discutidos na seguinte ordem:

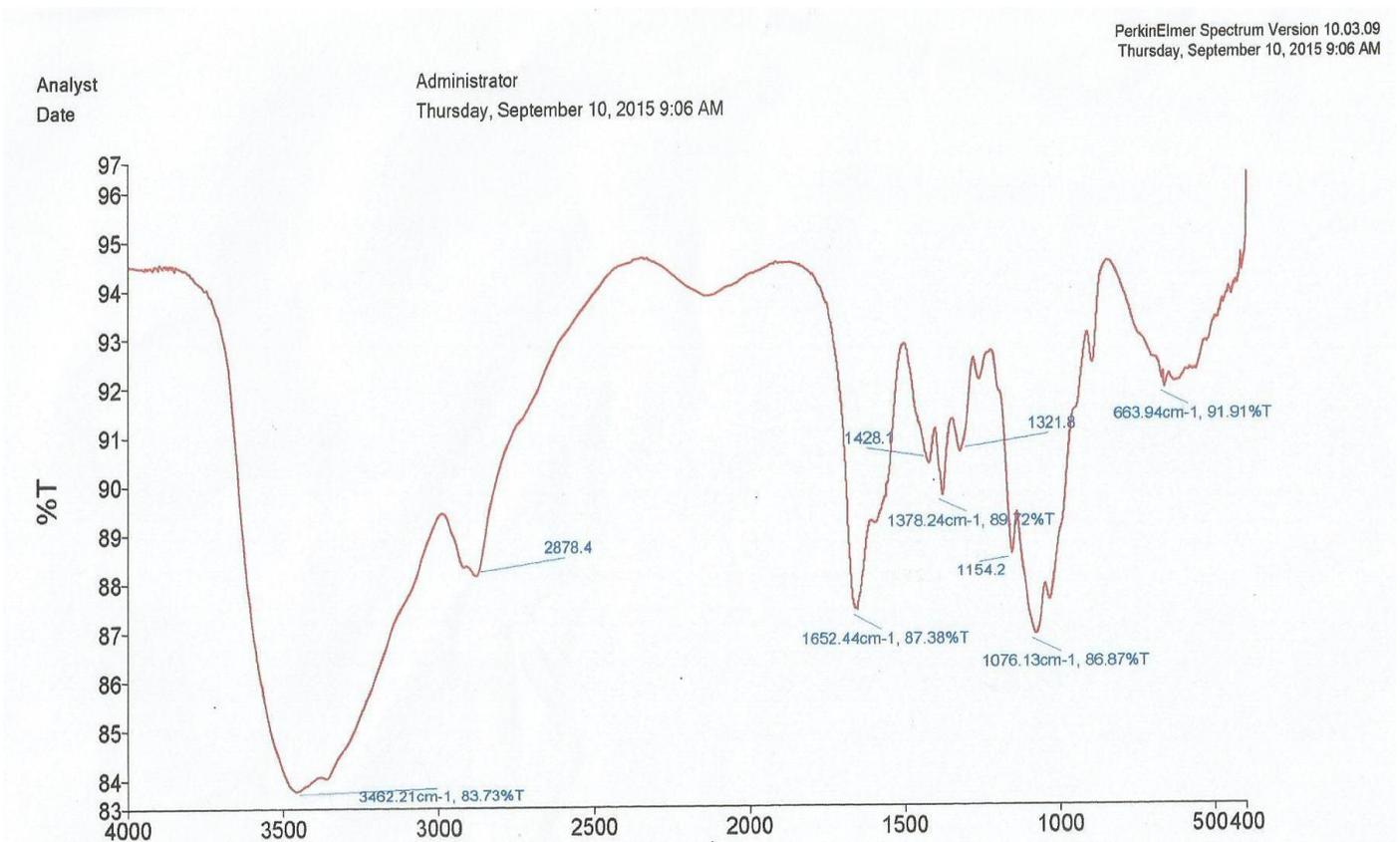
1. Caracterização físico-química da quitosana.
2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da quitosana.
3. Interferência da quitosana sobre a sobrevivência de *S. aureus* e *L. monocytogenes* em hambúrgueres com e sem adição de quitosana.
4. Verificação das características de qualidade do hambúrguer adicionado de gel de quitosana durante armazenamento (análises microbiológicas, físico-química e sensorial).

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS

Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana. A Figura 02 apresenta o espectro de infravermelho da quitosana Sigma® e a Tabela 02 mostra as bandas observadas no espectro e suas tentativas de atribuições.

Figura 02: Espectro no infravermelho da quitosana Sigma®.**Tabela 02:** Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana Sigma®.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Tentativas de atribuições
663 a 1076	Anéis piranosídicos
1378	($-\text{CH}_2 - \text{OH}$) $\nu_{\text{C-O}}$
1428,1	(amida) $\nu_{\text{C-N}}$
1595,7	(amida II) δ_{NH}
1652	(amida I) $\nu_{\text{C=O}}$
2878,4	$\nu_{\text{C-H}}$
3462	$\nu_{\text{O-H}}$
	(amina) δ_{NH}

O espectro obtido para a quitosana Sigma® mostra um pico largo em 3462cm^{-1} , na região correspondente ao estiramento OH, a qual aparece sobreposta à banda de deformação axial NH do grupo amina concordando com os resultados encontrados por Nunthanid et al. (2001). Além disto, Figueiredo (2002) relata que o grupo amina primário livre ($-\text{NH}_2$) na posição C_2 da glucosamina também apresenta outro pico na região entre 1220 e 1020cm^{-1} o qual foi observado no espectro da figura 02 em 1076cm^{-1} .

O pico em $2878,4\text{cm}^{-1}$ representa o estiramento C-H alifático e o pico em 1652cm^{-1} corresponde à banda de deformação axial C=O do grupo amida I da quitina, indicando que a amostra não está totalmente desacetilada. Enquanto que, o modo vibracional da deformação angular da ligação N-H (amida II) aparece como um ombro em $1595,7\text{cm}^{-1}$ (Figueiredo, 2002; Berger et al, 2014a).

O pico em 1378cm^{-1} representa o estiramento C-O do grupo alcoólico primário ($-\text{CH}_2 - \text{OH}$). A deformação axial de C-N da amida aparece em $1428,1\text{cm}^{-1}$. E a banda intensa entre 663 e 1076cm^{-1} está relacionada aos anéis piranosídicos, assim como foi relatado por Shigemasa et al. (1996), Bento et al. (2009) e Fai et al. (2011).

Grau de Desacetilação

O grau de desacetilação é considerado um dos principais parâmetros na caracterização da quitina e da quitosana. Ele é definido como sendo o número de grupos amina em relação ao número de grupos amida da cadeia polimérica. Vários métodos já foram propostos para a sua determinação tais como: espectroscopia no infravermelho, no ultravioleta, RMN ^1H , RMN ^{13}C , análise elementar e titulações potenciométrica e condutimétrica. No presente trabalho, dois destes sete métodos foram realizados para determinar o grau de desacetilação da quitosana: 1) ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e 2) Análise elementar.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A ressonância magnética nuclear de ^1H é uma técnica que permite a quantificação de alto grau de desacetilação. A preparação da amostra é simples por diversos motivos, tais como: não há necessidade de preparar curva analítica; utiliza uma pequena quantidade de substância

(miligramas) e não precisa purificá-la (caso os picos de impurezas não tenham o mesmo deslocamento químico dos picos relevantes da quitosana). Segundo Lavertu et al. (2003) a determinação do grau de desacetilação por RMN ^1H é feita utilizando uma relação entre os picos referentes aos prótons do grupo acetoamido da quitina e os outros prótons, exceto o próton do carbono anomérico (C_1) da quitosana/quitina.

Nesta técnica a amostra de quitosana é dissolvida em solução de ácido clorídrico deuterado resultando em uma solução viscosa, fazendo-se necessário que a medida seja realizada a 50°C para impedir interações intermoleculares e intramoleculares. Visto que, estas interações modificam o tempo de relaxação responsável pela integração dos picos influenciando, desta forma, o valor do grau de desacetilação. Assim também, é necessário que as medidas sejam realizadas rapidamente, de modo a minimizar problemas causados pela hidrólise da quitosana, ou seja, a quebra das ligações glicosídicas que formam o biopolímero. A Figura 03 mostra o espectro de RMN ^1H para a quitosana Sigma® e a tabela 03 a integração dos picos do espectro de RMN ^1H (STAMFORD-ARNAUD, 2012).

Figura 03: Espectro de RMN ^1H da quitosana Sigma®.

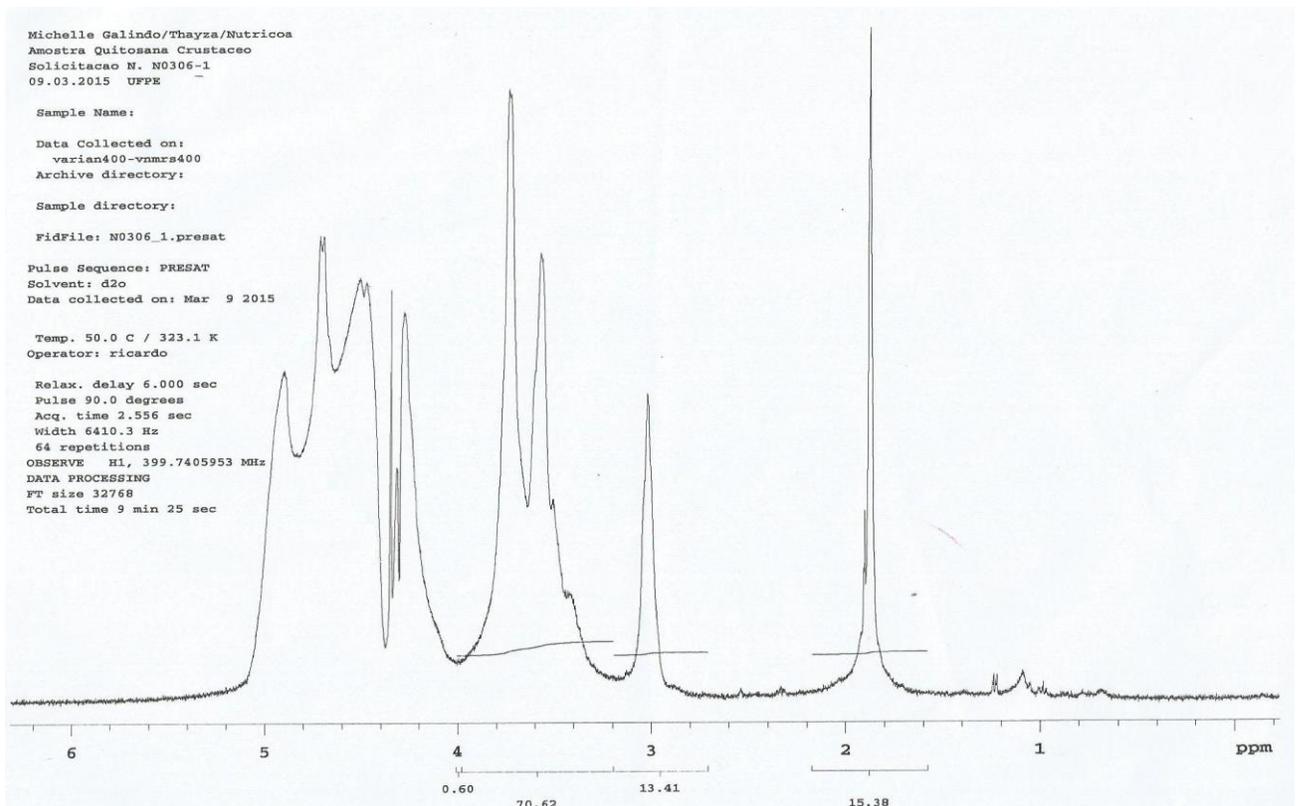


Tabela 03: Integração dos picos do espectro de RMN ^1H da quitosana Sigma® para o cálculo do grau de desacetilação.

Hidrogênios	Integração dos picos
	Quitosana Sigma®
H^{ac}	15,38
H^2	13,41
$\Sigma \text{H}^{2,3,4,5,6,6'}$	84,03

O grau de desacetilação foi calculado pela equação 1, proposta por Hirai et al. (1991), que utiliza os sinais dos prótons H^2 , H^3 , H^4 , H^5 , H^6 , $\text{H}^{6'}$ (H^{2-6}) de ambos os monômeros e o pico referente aos núcleos do hidrogênio do grupo acetoamido (H^{ac}).

$$GD(\%) = \left(1 - \left(\frac{1}{3} H^{\text{ac}} / \frac{1}{6} H^{2-6} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

O valor do grau de desacetilação calculado pela equação de Hirai et al. (1991) foi de 64%.

ANÁLISE ELEMENTAR

A análise elementar é outra ferramenta que pode ser utilizada para a determinação do grau de desacetilação da quitosana. Apesar de ser um método preciso, deve ser usado com muita cautela em virtude dos diferentes teores de hidratação, que variam de acordo com as condições de armazenamento e tratamento prévio da amostra. A equação 2 foi proposta por Kassai, Arul & Charlet (2000) para determinar o grau de desacetilação da quitosana tendo em vista a relação entre carbono e nitrogênio a qual pode ser obtida pela análise elementar.

$$GD\% = \left(1 - \frac{(C/N) - 5,145}{6,816 - 5,145} \right) \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

Onde C/N é a razão de carbono/nitrogênio. Esta razão de acordo com Kassai & Arul & Charlet (2000) varia de 5,145 em quitosana completamente desacetilada (monômero da quitosana) a 6,816 em quitina inteiramente acetilada (monômero da quitina).

A Tabela 04 mostra os percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, a relação carbono/nitrogênio e o grau de desacetilação encontrado na amostra de quitosana analisada.

Tabela 04: Percentuais de carbono, nitrogênio, hidrogênio, relação carbono / nitrogênio e o grau de desacetilação da amostra de quitosana.

Quitosana	C %	N %	H %	C/N	GD%
Sigma ®	41,3782	7,4331	7,3555	5.67	74,75%

Este método só apresenta resultados precisos para a quitosana que não tem resíduos de proteínas, caso contrário, é necessário purificar a quitosana (STAMFORD-ARNAUD, 2010).

O valor do grau de desacetilação calculado pela equação de Signini e Campana Filho (2000) diferiu do calculado a partir da análise elementar da quitosana, como mostra a tabela 05. O resultado do grau de desacetilação da quitosana mais próximo ao fornecido pelo fabricante (>85%) foi obtido pela análise elementar (75%). O que poderia justificar o resultado do grau de desacetilação ter dado superior para a análise elementar, é o fato da quitosana Sigma® não ser purificada, ou seja, o biopolímero deve apresentar proteínas residuais.

Como a substância analisada é um polímero, vale salientar que a RMN é uma técnica bastante utilizada para analisar polímeros e determinar a pureza de amostras o que a torna um método confiável para este experimento.

Tabela 05: Valores dos graus de desacetilação em porcentagem da quitosana determinados por RMN ¹H e Análise Elementar.

Quitosana	RMN ¹ H	Análise Elementar
Sigma®	62%	75%

Desta forma, embora tenham sido obtidos valores do grau de desacetilação diferentes, dependendo da técnica empregada, o presente estudo considera o GD da quitosana Sigma® igual a 62%. Segundo Peter (1995), a quitina e quitosana podem ser diferenciadas pelo grau de

desacetilação (GD) de tal forma que quando o polímero possui o $GD \leq 60\%$ é considerada quitina. E quando o grau de desacetilação for superior a 60%, o polissacarídeo é denominado de quitosana.

Massa Molar

MEDIDAS DE VISCOSIDADE

As propriedades físico-químicas da quitosana dependem não somente do grau de desacetilação, mas também da sua massa molar média. As determinações da massa molar média de polímeros podem ser realizadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) ou por medidas de viscosidade.

A cromatografia de permeação em gel também chamada de cromatografia de exclusão de tamanho é o método mais utilizado para a determinação da distribuição da massa molar de polímeros (Stevens, 1999). Uma coluna cromatográfica separa as frações cujas massas molares apresentam pequena variação. No caso da quitosana, tem sido discutido o efeito da natureza química dos padrões de calibração sobre a determinação de massa molar por GPC. Segundo Tsaih & Chen (1999), os melhores resultados são obtidos através de padrões de calibração da própria quitosana. Entretanto, a maior dificuldade surge da inexistência de amostras comerciais desses padrões. Assim, para a determinação da massa molar média da quitosana utilizada neste estudo, realizou-se medida de viscosidade.

A viscosidade de soluções poliméricas é a medida do volume hidrodinâmico (tamanho ou extensão no espaço) do polímero em solução. A viscosidade de soluções poliméricas diluídas é consideravelmente maior que a do solvente puro, ou de soluções diluídas de pequenas moléculas. Isso se deve à grande diferença de tamanho entre as moléculas do polímero e a do solvente. A viscosidade aumenta à medida que as dimensões das moléculas poliméricas em solução aumentam. Assim, a viscosidade polimérica é o resultado da comparação entre o tempo de escoamento do solvente em um capilar e o tempo de escoamento da solução polimérica a determinada concentração e temperatura. Embora seja um método não absoluto, a medida de viscosidade pode ser utilizada para estimar/determinar a massa molar média de polímeros, utilizando-se um viscosímetro e um capilar tipo Cannon-Fenske.

A razão do tempo de escoamento da solução do polímero pelo tempo de escoamento da solução do solvente é chamada de viscosidade relativa. A viscosidade específica da quitosana foi calculada aplicando a média dos tempos de escoamento na expressão descrita abaixo (equação 03). Ambas as viscosidades são adimensionais.

$$\eta_{esp} = \eta_{rel} - 1 \quad \text{Eq.03}$$

Onde: η_{rel} = viscosidade relativa da amostra

Viscosidade reduida é a viscosidade específica dividida pela concentração e tem como dimensão o inverso da concentração.

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C} \quad \text{Eq. 04}$$

Onde: η_{red} = viscosidade reduzida da amostra; C = concentração em gramas de polímero em 100 mL de solução.

A viscosidade intrínseca da quitosana foi encontrada pela extrapolação do gráfico de viscosidade reduzida versus concentração à diluição infinita, com base na equação 05 de Huggins (1942) mostrada abaixo:

$$\eta_{red} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C \quad \text{Eq.05}$$

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica está relacionada com a massa molar viscosimétrica média (Tabela 06), através da equação de Mark-Houving (Eq. 06). O valor da constante K e a dependem do polímero, do solvente e da temperatura. Neste trabalho o solvente utilizado foi o ácido clorídrico na temperatura de 25°C o qual apresenta os valores de $1,81 \times 10^{-5}$ e 0,93 para K e a , respectivamente.

$$[\eta] = K \left(\bar{M}_v \right)^a \quad (\text{Eq.06})$$

Tabela 06: Valor da viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica média da quitosana estudada.

Quitosana	Viscosidade intrínseca $[\eta]$ (mL/g)	Massa molar média (g/mol)
Peso Médio	0,584	$7,4 \times 10^4$

A massa molar média da quitina está entre $1,03 \times 10^6$ a $2,5 \times 10^6$ g/mol. Na obtenção da quitosana pela reação de desacetilação, este valor é reduzido para 5×10^5 a 5×10^4 g/mol. O valor da massa molar média da quitosana em estudo foi de $7,4 \times 10^4$ e está de acordo com os relatados na literatura por Berger et al. (2014a).

5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DA QUITOSANA

A atividade antimicrobiana da quitosana em relação às bactérias testes (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) foram avaliadas segundo a determinação da CIM e da CBM para 48 horas de crescimento bacteriano. Observou-se que a quitosana inibiu o crescimento das bactérias testadas, com efeito estático e cida, similar para ambas bactérias, sendo CIM $2,5 \text{mg.mL}^{-1}$ e CBM $5,0 \text{mg.mL}^{-1}$. Dessa forma para os ensaios de bioatividade da quitosana em hambúrgueres foram adotados os valores correspondentes a CIM e CBM.

Esses resultados encontrados, estão de acordo com Stamford et al. (2013), que refere em seu estudo CIM de $2,5 \text{mg/mL}^{-1}$ e 5mg.mL^{-1} do antimicrobiano quando aplicado em *S. aureus*. Resultados similares foram encontrados por Bento et al. (2009) ao analisar a bioatividade da quitosana no controle de *L. monocytogenes* em produto cárneo. Em contrapartida, Berger et al (2014) ao testar quitosana fungica de baixo peso molar, obteve CIM de $300 \mu\text{g/mL}$ e CBM de $500 \mu\text{g/mL}$. Assim como Fai & Stamford & Stamford (2008) ao empregar o antimicrobiano na inibição de *S. aureus*, obteve uma CIM de $1,25 \text{mg.mL}^{-1}$, entretanto a CBM foi 5mg.mL^{-1} corroborando com a obtida neste estudo. Tsai & Hwang (2004) ao examinar a atividade

antimicrobiana *in vitro* frente a algumas bactérias patogênicas, relataram que a concentração mínima letal de quitosana para *S. aureus* foi de 50 a 200 p.p.m., o equivalente a 0,05mg.mL⁻¹ a 0,2 mg.mL⁻¹. Diante dessas constatações podemos perceber que a bioatividade da quitosana pode variar de acordo com a dosagem utilizada, o microrganismo e meio de cultivo empregado.

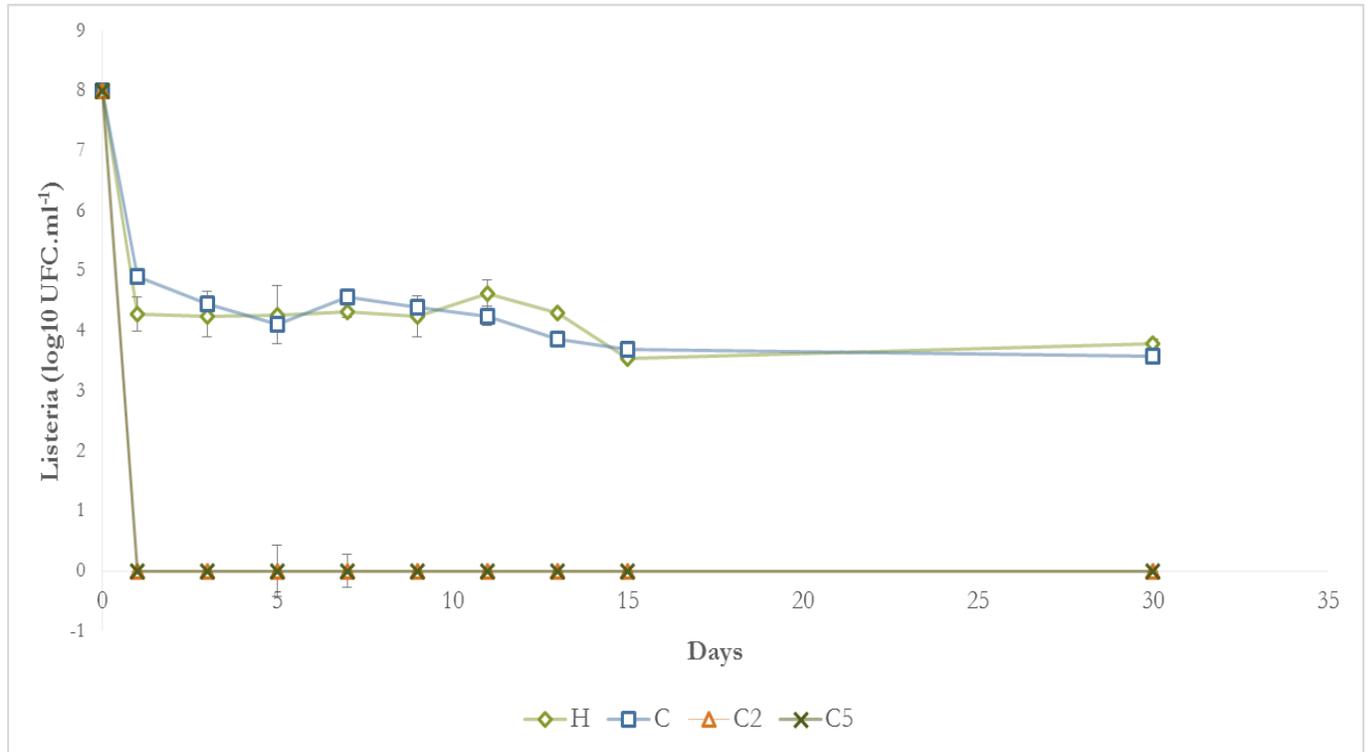
A quitosana como bactericida ou bacteriostática tem sido alvo de vários estudos. Segundo Kim & Choi (1988) e Dutta &Tripathi & Dutta (2011) a quitosana apresenta várias vantagens sobre outros tipos de antimicrobianos, pois possui uma atividade antibacteriana superior e um espectro de atividade maior. Porter & Black & Drolet (2000) ao conduzirem testes *in vitro* a fim de testar a ação antimicrobiana da quitosana utilizando soluções a 1 e 2%,obtiveram três grupos de bactérias quanto a sua sensibilidade à quitosana: completamente inibido (*Bacillus cereus*, *Shigella sonnei* L. *monocytogenes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Yersina enterocolitica*), muito inibido (*Escherichia coli*. *Shigella flexneri*,*Pseudomonas lundensis*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*) e parcialmente inibido (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*). De acordo com Kanatt & Chander & Sharma (2008) os valores que podem ser considerados como CIM da quitosana podem variar entre 0,1 a 10mg.mL⁻¹ a depender da quantidade de patógenos existentes no alimento.

5.3 INTERFERÊNCIA DA QUITOSANA SOBRE A SOBREVIVÊNCIA MICROBIANA (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) EM HAMBÚRGUERES

A sobrevivência de *L. monocytogenes* ATCC 7664 em hambúrguer com e sem gel de quitosana ao longo de 30 dias é mostrada na Figura 04. No 1º dia foi observado redução logarítmica para todas as amostras. As amostras Controle e Hambúrguer Comercial apresentaram uma redução de 3log₁₀, porém as amostras com 2.5 e 5.0 mg.mL⁻¹ de quitosana apresentaram uma redução de 8log₁₀, tendo efeito cida. A partir do 3º dia, não foi observado alterações das leituras.

O efeito cida da quitosana para *L. monocytogenes* é causado pela interação electrostática entre os grupos NH₃⁺ de quitosana e os grupos fosforilo carregados negativamente de componentes de fosfolípidos da membrana das células (LIU & ZHANG & XIA, 2004; BERGER et al., 2014b).

Figura 04: Interferência da quitosana sobre a sobrevivência de *listeria monocytogenes* em hambúrgueres armazenados a -18°C durante o período de 30 dias.



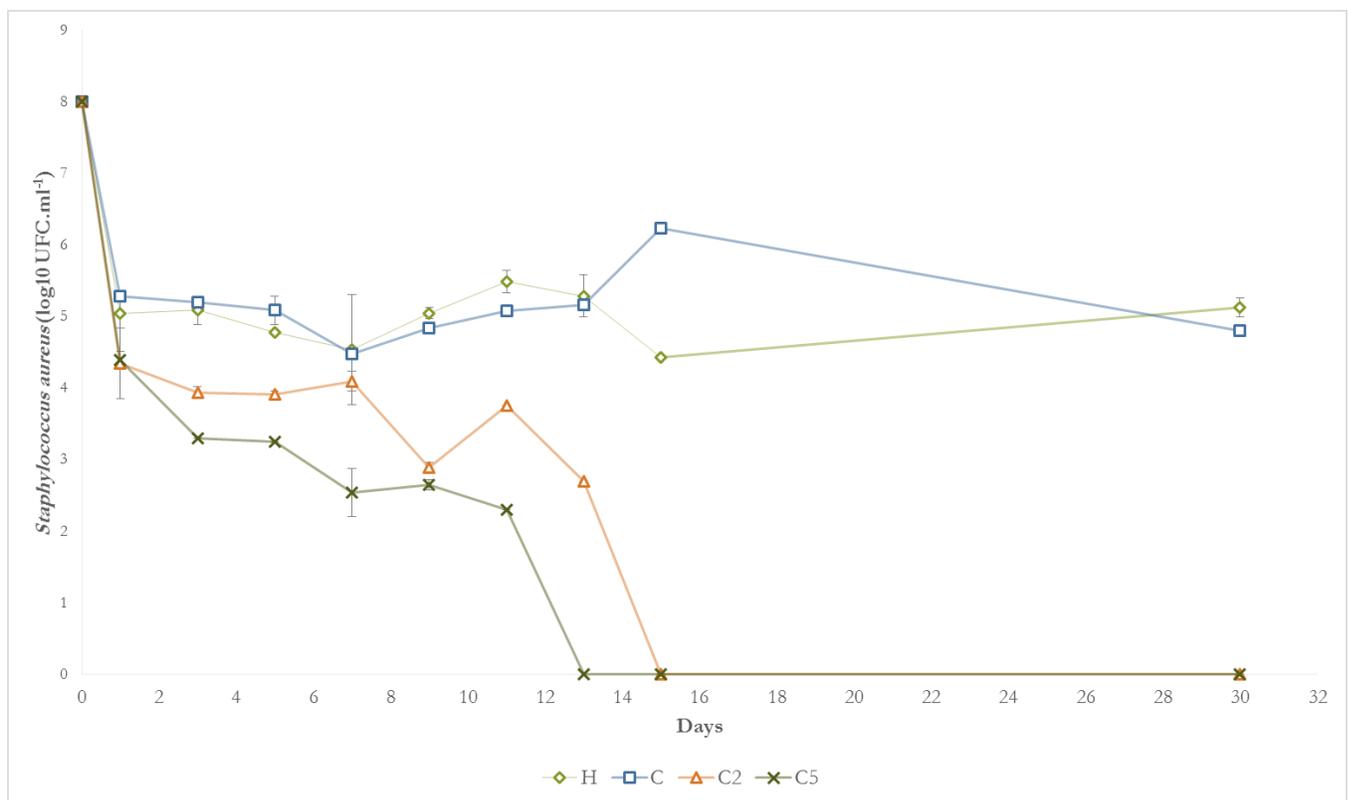
Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2,5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

A redução da carga microbiana apresentada nas quatro amostras, na fase inicial, pode ser explicado devido o congelamento ser um método de retardo do crescimento microbiano. No estágio inicial do congelamento é quando ocorre maiores reduções na população de diferentes bactérias, o que está relacionado às condições de adaptação dos micro-organismos psicotróficos que frequentemente se adaptam após um tempo em ambientes frios. *L. monocytogenes* é conhecida por se adaptar às temperaturas mais baixas por produção de fosfolípidios com ácidos graxos mais curtos e mais ramificados (VELDHUIZEN & CREUTZBERG, 2007). Gounadaki et al. (2007) ao estudar a sobrevivência de *L. monocytogenes* em salame cortado também demonstrou que a redução bacteriana foi superior à temperatura ambiente (25°C) quando comparada a menores temperaturas (15°C e 5°C).

A figura 5 mostra a sobrevivência de *S. aureus* ATCC 6538 em hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana durante 30 dias de armazenamento. Todas as amostras apresentaram

uma redução superior a $3\log_{10}$ no 1º dia. Porém no 13º dia de armazenamento as amostras contendo gel de quitosana (C₂ e C₅) apresentaram uma redução superior às amostras C e H. A amostra C₅ apresentou efeito cida, o que também foi observado na amostra C₂ no 15º dia. A partir do 15º dia não houve redução logarítmica significativa nas amostras C e H, e as amostras C₂ e C₅ mantiveram efeito cida.

Figura 05: Interferência da quitosana sobre a sobrevivência de *Staphylococcus aureus* em hambúrgueres armazenados a -18°C durante o período de 30 dias.



Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2,5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Chung & Chen (2008) ao investigar a atividade antimicrobiana da quitosana de baixo peso molecular, avaliando as taxas de mortalidade de *S. aureus*, demonstraram que a quitosana pode destruir a estrutura celular deste micro-organismo. Os autores relatam que a quitosana reage tanto com a parede celular como com a membrana celular, mas isso não ocorre simultaneamente. Essas interações ocorrem por mecanismo sequencial de duas etapas: primeiramente uma

separação da parede celular seguida por destruição da membrana celular.

O mecanismo de ação da quitosana sobre os micro-organismos não está completamente elucidado, mas várias propostas são sugeridas. Estudos tem descrito que o mecanismo de atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas de sua solução (grau de desacetilação e massa molar), concentração utilizada e tempo de exposição, além das características da membrana do micro-organismo (KANATT & CHANDER & SHARMA, 2008; NO et al., 2007). Estudos supõem que a natureza catiônica da quitosana, transmitida pelos NH_3^+ grupos de glucosamina carregados positivamente, pode ser um fator fundamental que contribui para a sua interação com a superfície da célula microbiana carregada negativamente, resultando em prejuízo de atividades vitais bacterianas (HELANDER et al., 2001; ZAKRZEWSKA et al., 2005; JE & KIM, 2006; BEVERLYA et al., 2008; KONG et al., 2010).

Wydro & Krajewska & Hac-wydro (2007) demonstraram que existem interações eletrostáticas e hidrofóbicas significativas, bem como ligações de hidrogênio entre os lipídeos da membrana bacteriana e a quitosana. Dessa forma entende-se que devem existir locais na superfície da célula em que a quitosana pode interagir com os lipídeos que se prolongam a partir da membrana, o que permite ao polímero a capacidade de extrair lipídeos da membrana bacteriana. Porém, Raafat et al. (2008) relatam que o modo de ação da quitosana não se limita a uma única molécula-alvo, mas que a morte resulta de uma sequência de eventos moleculares, ocorrendo simultaneamente ou sucessivamente, sem um alvo definido.

5.4 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DO HAMBÚRGUER ADICIONADO DE QUITOSANA DURANTE O ARMAZENAMENTO

Os resultados das análises microbiológicas das amostras atestaram a viabilidade da execução da análise sensorial, uma vez que os parâmetros de ausência de *salmonella sp*/25g, máximo de 5×10^3 UFC/g de Coliformes a 45°C/g, 5×10^3 UFC/g de *Staphylococcus coagulase positiva*/g e 3×10^3 UFC/g de *Clostridium Sulfito redutor* a 46°C/g foram mantidos, segundo exigido pela RDC nº12 (BRASIL, 2001) durante todo o armazenamento.

Na tabela 07 estão os resultados das análises físico-químicas realizadas a cada 30 dias durante os 120 dias de armazenamento.

Tabela 07: Análise físico-química de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.

	DIAS					
	PRODUTOS	0	30	60	90	120
UMIDADE (%)	H	67,34±0,36Bc	67,63±0,24Bc	67,29±0,04Bc	67,18±0,12Bc	68,54±0,21Ac
	C	67,43±0,09ABc	67,67±0,14Ac	67,64±0,08Ac	67,65±0,28Ac	67,17±0,18Bd
	Q_{2.5}	74,44±0,51Ab	74,07±0,18Ab	73,74±0,30ABb	73,25±0,28Bb	73,00±0,14Bb
	Q_{5.0}	76,88±0,18Aa	76,76±0,12Aa	76,16±0,09Ba	75,60±0,07Ca	75,87±0,11BCa
CINZAS (%)	H	2,28±0,02Ba	2,38±0,03Aa	2,18±0,05Ca	2,46±0,03Aa	2,28±0,03Ba
	C	1,90±0,07Bb	2,05±0,06Bb	2,06±0,05Bb	2,38±0,03Ab	2,05±0,07Bb
	Q_{2.5}	1,69±0,01Bc	1,79±0,01Ac	1,80±0,01Ac	1,77±0,01Ac	1,78±0,01Ac
	Q_{5.0}	1,57±0,01Bd	1,55±0,02Bd	1,57±0,01Bd	1,64±0,01Ad	1,55±0,01Bd
PROTEÍNAS (%)	H	14,56±0,01Ac	14,37±0,01Bb	14,20±0,01Cd	14,32±0,03Bd	13,96±0,03Dd
	C	19,04±0,08Aa	17,76±0,02Ba	17,12±0,04Ca	17,84±0,03Ba	18,57±0,03Da
	Q_{2.5}	15,36±0,02Ab	14,28±0,02Db	14,91±0,01Cc	15,03±0,03Bb	15,05±0,03Bc
	Q_{5.0}	14,16±0,02Ed	14,96±0,05Cc	15,29±0,01Bb	14,74±0,03Dc	15,70±0,01Ab
GORDURA (%)	H	14,19±0,02Ba	13,90±0,02Ca	14,67±0,03Aa	14,68±0,01Aa	14,70±0,01Aa
	C	4,19±0,03Eb	5,33±0,03Bb	5,84±0,02Ab	5,22±0,03Cb	5,13±0,03Db
	Q_{2.5}	1,84±0,01Dc	1,50±0,02Ec	2,22±0,01Cc	3,12±0,03Bc	3,70±0,01Ac
	Q_{5.0}	1,36±0,01Ed	1,50±0,01Dc	2,13±0,02Cd	2,82±0,03Bd	3,27±0,01Ad
CARBOIDRATO(%)	H	1,92±0,01Ad	1,92±0,01Ad	1,77±0,03Bc	1,51±0,03Cd	0,75±0,04Dd
	C	7,65±0,04Aa	7,40±0,06Bb	7,50±0,05Ba	7,15±0,03Cb	7,26±0,03Ca
	Q_{2.5}	7,08±0,03Db	8,51±0,02Aa	7,59±0,03Ba	7,31±0,03Ca	6,63±0,03Eb
	Q_{5.0}	6,20±0,03Ac	5,35±0,01Dc	4,97±0,01Bb	5,03±0,05Bc	3,73±0,02Cc
VCT (calorias)	H	193,65±0,34Ba	190,35±0,25Ca	195,61±0,85Aa	195,48±0,41Aa	191,14±0,41Ca
	C	144,49±0,73Db	148,65±0,59Bb	151,11±0,56Ab	147,01±0,35Cb	149,51±0,23Bb
	Q_{2.5}	106,36±0,35Dc	104,75±0,36Dc	110,00±0,32Cc	116,09±2,39Bc	120,02±0,35Ac
	Q_{5.0}	93,72±0,35Cd	94,66±0,01Cd	100,22±0,36Bd	105,90±1,25Ad	107,17±0,27Ad

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na horizontal no mesmo produto e na mesma análise, não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Ducan.

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na vertical na mesma análise e no mesmo dia de armazenamento não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Ducan.

Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2.5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana, Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e VCT= Valor calórico Total

Os valores de umidade encontrados demonstram que as amostras contendo gel de quitosana apresentaram percentuais superiores às amostras sem o gel, sendo a amostra Q_{5.0} a que apresentou os maiores percentuais, por apresentar a maior concentração gel de quitosana. Cé (2009) ao incorporar filme de quitosana em morango também encontrou um maior valor de umidade nas suas amostras. Damian (2005), ao avaliar a composição de salsicha adicionado de quitosana, observou aumento da umidade devido a inclusão do gel, assim como Sousa et al. (2012), ao testar nova formulação de hambúrguer, também encontrou aumento na umidade do produto.

Ferreira, et al. (2003) relataram que o teor de gordura é inversamente proporcional ao de umidade. Em experimentos relacionados com a elaboração de salsichas, observaram que, à medida que aumentaram o teor de gordura no produto, houve uma redução no percentual de umidade. Resultados semelhantes foram observados por Hughes, Cofrades e Stroy (1997) ao produzirem salsichas com 5, 12 e 30 % de gordura, obtiveram resultados relacionados com os teores de umidade equivalentes a 75, 67 e 51 %, respectivamente.

Os valores de cinzas obtidos alteraram ao longo do tempo e entre as amostras durante todo o período de armazenamento. Os valores observados nas amostras Q_{2.5} e Q_{5.0} foram inferiores aos das amostras C e H, variando entre 1,55% e 2,38%, resultados esses semelhantes ao citado pela literatura (TACO, 2011) para hambúrguer bovino cru, no qual apresenta 2,9g/100g de cinzas. Marques (2007) em seu trabalho obteve resultados semelhantes para cinzas, valores que variaram de 2,58% a 2,90% em estudo com produtos tipo hambúrguer bovino adicionado de farinha de aveia.

Os valores encontrados para a proteína nas 04 amostras analisadas estão próximos aos 15% que a legislação preconiza, entretanto, vale salientar que as amostras que apresentaram valores inferiores ao preconizado, foram semelhantes aos produtos industrializados. Os maiores valores encontrados foram (19,04) na amostra C, e os menores na amostra H (13,96) e Q5 (14,16). Estes resultados corroboram com Damian 2005, que ao incluir maiores percentuais de quitosana, também observou redução no valor protéico do produto final.

Ao analisar os valores de proteína para cada amostra, observa-se que em todas as amostras, ao longo do armazenamento, estes sofreram pequenas variações. Tais resultados corroboram com os achados de Machado (2009), que ao estudar o efeito do congelamento e estocagem sobre a qualidade da carne bovina, também demonstrou que ao longo do período de armazenamento (120 dias) não ocorre diferença significativa entre os percentuais de proteína.

Ainda na tabela 07, encontramos os percentuais de lipídeos das amostras durante o armazenamento. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Leonardi et al. (2009), quando avaliou a composição nutricional de hambúrgueres e almôndegas e verificou o teor de lipídeos de 1,78%. Marques (2007) também obteve baixos teores de lipídeos para o seu produto (1,12%) ao avaliar hambúrguer de carne bovina adicionado de farinha de aveia e Sousa et al. (2012) obteve 0,13% de lipídeo em estudo com hambúrguer de carne bovina e soja texturizada adicionados de casca de melancia desidratada. Resultados superiores para lipídio foram encontrados por Damian (2005), ao avaliar a adição da quitosana em salsichas, obtendo o valor médio de 7.5%, entretanto, vale ressaltar que em tal estudo, a inclusão de maior percentual de quitosana, também ocasionou na redução do lipídio no produto final.

As diferenças dos resultados entre os estudos podem ser atribuídas a quantidade de gel de quitosana adicionado, diferentes formulações (produtos), como também à composição centesimal da carne de boi, que segundo Olivo (2004), varia de acordo com fatores extrínsecos como, alimentação, stress e idade do animal, o músculo de origem, teor de gordura e o tipo de corte o que pode interferir significativamente na composição do produto. Entretanto, todas as amostras obtiveram valores de lipídeos de acordo com a legislação vigente, que estabelece o máximo de 23%, apresentando um aumento gradativo nos valores em todas as amostras (BRASIL, 2000).

Outro achado importante deste estudo a partir dos resultados é que a inclusão do gel de quitosana reduziu o percentual de lipídeo das amostras Q_{2,5} e Q_{5,0} em mais de 25% em relação as amostras C e H. Segundo a legislação, a redução a partir de 25% de gordura pode caracterizar um produto como light em relação a outro convencional. Dessa forma, as amostras Q_{2,5} e Q_{5,0} mostram-se como uma versão light das amostras C e H. O fato das amostras Q_{2,5} e Q_{5,0} terem sido elaboradas isentas de aditivos químicos, somada à redução do percentual de gordura e consequente redução calórica, torna os hambúrgueres adicionados de gel de quitosana, alimentos do ponto de vista nutricional, mais saudáveis que às amostras H e C. Essa questão torna-se ainda mais relevante quando analisamos o perfil dos consumidores de hambúrgueres, que na sua maioria são jovens e apresentam um alto consumo de alimentos com percentuais elevados de gordura e caloria, como constatado por Meira (2013) ao analisar o perfil do consumidor na atualidade.

Ao avaliar os valores de lipídios ao longo do tempo, observou-se que embora o teor de lipídeo tenha aumentado, nenhuma das amostras apresentou rancidez durante todo o período de

armazenamento. Pesquisas apontam que o aumento do lipídio é devido ao processo de desintegração que ocorre na membrana das células da carne, devido à moagem, mudança de temperatura e interação com outros constituintes, favorecendo assim a oxidação lipídica, e aceleração deste processo (PEARSON & LOVE & SHORLAND, 1977; TORRES et al., 1998). Machado (2009), também observou um aumento na taxa de oxidação lipídica em carne moída ao longo dos 120 dias de estocagem sob congelamento, o que diferiu dos resultados encontrados.

Ferreira & Santos & Medeiros (2001) quando estudaram as alterações oxidativas de hambúrgueres de carne bovina armazenados sob diversas temperaturas de congelamento concluiu que o surgimento do ranço oxidativo em hambúrguer é inversamente proporcional a temperatura de armazenamento uma vez que os resultados demonstraram que o ranço pronunciado foi detectado depois de 15 dias de armazenamento a temperatura de -1°C , 30 dias de armazenamento à -8°C e à -18°C somente a partir de 90 dias.

Esses resultados apontam que o baixo valor de gordura utilizado nas amostras, somado a adição dos antimicrobianos naturais podem ter auxiliado no efeito protetor evitando assim a oxidação lipídica. Darmadji & Izumimoto (1994) observaram que a oxidação lipídica da carne armazenada a 4°C durante 10 dias foi reduzida com a adição de quitosana. Kanatt & Chamder & Sharma (2004) também observaram resultados semelhantes ao incorporar a quitosana na carne de cordeiro submetida ao processo de radiação, alegando seu efeito como agente de controle da oxidação lipídica. Em contra partida Igene et al. (1979), quando avaliou os valores de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para carne bovina congelada, pelo método de destilação, observou que houve aumento na rancidez. Stika & Xiong & Suman (2007) observaram um aumento significativo nos valores de TBA da carne bovina com o decorrer da estocagem sob uma temperatura de congelamento de -29°C .

Os percentuais de carboidratos dos hambúrgueres adicionados de gel de quitosana estão acima do recomendado pela legislação vigente, que estabelece o percentual máximo de 3%. Valores também superiores a legislação foram encontrados por outros autores, em estudo (TAVARES *et al.*, 2007) utilizando hambúrguer de coelho, com 8,9% de carboidrato, e hambúrguer de caju com 18% (LIMA, 2008). Segundo García et al. (2002), uma vantagem no elevado valor de carboidrato encontrado, está na capacidade de retenção de água, uma vez que as fibras e os carboidratos melhoram o rendimento durante o cozimento e realçam a textura.

Os valores elevados encontrados nas amostras Q_{2,5} e Q_{5,0}, eram esperados uma vez que as amostras apresentaram valores baixos no quesito gordura, quando comparada a outras formulações, contribuindo para um aumento na proporção de carboidrato, já que este foi calculado por diferença. Em contraposição Leonardi et al. (2009) observou valores inferiores de carboidrato em hambúrguer de carne bovina.

Tais características conferem ao hambúrguer bovino adicionado de gel de quitosana diversas vantagens nutricionais, uma vez que possui alto teor de carboidrato e baixos valores de lipídeos, caracterizando o produto como uma alternativa de alimentação para grupos da população que estão em busca de um produto menos calórico.

Na tabela 08 podemos verificar que os valores de Aw encontrados nas amostras variaram de 0,972 e 0,982. Esses valores são considerados altos, porém não influenciaram na conservação dos hambúrgueres, uma vez que estes foram conservados congelados. Esses resultados estão próximos dos achados de Marques (2007), que verificou um valor de 0,98 – 0,97 de atividade de água para hambúrguer bovino.

Tabela 08: Valores de Aw de haburgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à – 18°C por 120 dias.

	PRODUTOS	DIAS				
		0	30	60	90	120
Aw	H	0,976±0,001Ba	0,975±0,001BCbc	0,978±0,001Aa	0,975±0,001BCc	0,974±0,001Cd
	C	0,974±0,001Cb	0,974±0,001Cc	0,972±0,001Db	0,976±0,001Bc	0,978±0,001Ac
	Q_{2,5}	0,976±0,001Ca	0,976±0,001Cab	0,978±0,001Ba	0,980±0,001Aa	0,980±0,001Ab
	Q_{5,0}	0,977±0,001Ba	0,977±0,001Ba	0,978±0,001Ba	0,978±0,001Bb	0,982±0,001Aa

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na horizontal no mesmo produto e na mesma análise, não diferem significativamente (p>0,05) pelo teste de Ducan.

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na vertical na mesma análise e no mesmo dia de armazenamento não diferem significativamente (p>0,05) pelo teste de Ducan.

Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2,5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Em relação ao pH, observamos na tabela 09 que os valores de pH encontrados variaram entre 6,26 e 5,09, corroborando com o pH da carne bovina, com valores em torno de 7 (Roca, 2001). Sobreiro & Souza (1996) quando avaliaram o estado de conservação de carne bovina moída preparada industrialmente, encontraram resultados similares com os achados desta pesquisa, onde os valores de pH encontrados pelos autores foram entre 5,67 e 5,51. Os menores valores encontrados foram em Q_{5.0} (5,09), fato este atribuído ao maior percentual de gel de quitosana presente na amostra, uma vez que foi preparado com ácido acético.

Tabela 09: Valores de pH de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à – 18°C por 120dias.

	DIAS					
	PRODUTOS	0	30	60	90	120
pH	H	6,17±0,01Ba	6,16±0,01Ba	6,15±0,01Ba	6,15±0,07Ba	6,26±0,01Aa
	C	5,54±0,02Ab	5,53±0,02Ab	5,54±0,01Ab	5,55±0,01Ab	5,57±0,01Ab
	Q_{2.5}	5,33±0,02Bc	5,33±0,02Bc	5,34±0,01Bc	5,35±0,01Bc	5,49±0,02Ac
	Q_{5.0}	5,17±0,01ABd	5,15±0,01BCd	5,13±0,01Cd	5,09±0,01Dd	5,19±0,01Ad

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na horizontal no mesmo produto e na mesma análise, não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Ducan.

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na vertical na mesma análise e no mesmo dia de armazenamento não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Ducan.

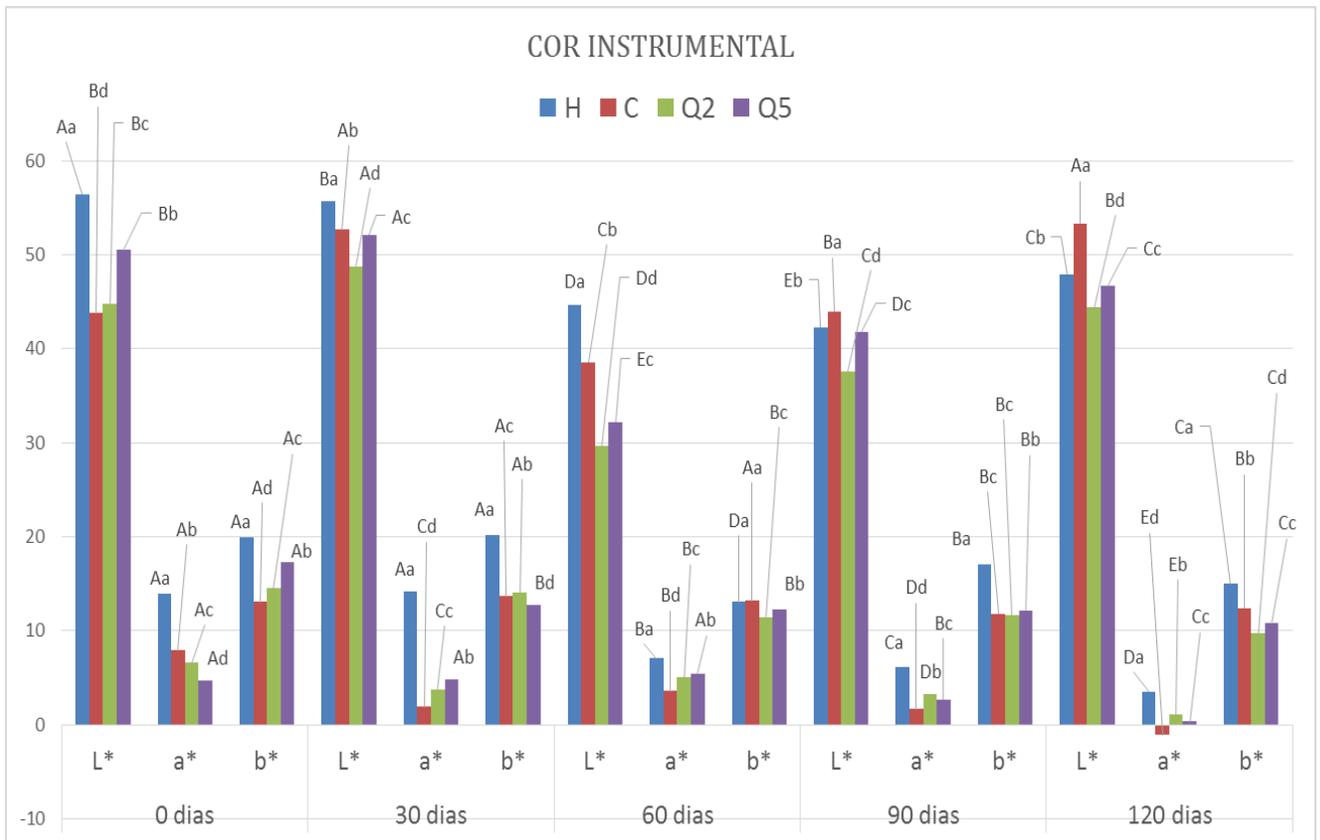
Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2.5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

No final do período de armazenamento, todas as amostras apresentaram elevação de pH, exceto a C. Segundo Roca (2001) o pH da carne após 24 horas varia de 5,5 - 5,9, devido ao processo de glicólise lenta. Resultados contraditórios foram encontrados por Gokalp *et al.* (1978), onde o pH foi constante em todo tempo de estocagem da carne bovina estocada congelada, durante 9 meses, a -22,3°C. Machado (2009) ao observar a carne bovina (contrafilé), encontrou ligeira queda do pH aos 120 dias de estocagem (-18°C).

Na figura 06 são apresentados os resultados de cor das amostras ao longo dos 4 meses de armazenamento. Apesar de serem observadas variações de valores durante o armazenamento com diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$), não foi observado tendência de redução ou

aumento nos valores, nas amostras C, Q_{2,5} e Q_{5,0}, caracterizando escurecimento ou clareamento das amostras. Portanto as alterações de cor observadas são provavelmente devido a problemas na homogeneidade das amostras, visto que foram elaboradas manualmente. Apenas a amostra H, elaborada industrialmente, mostrou uma tendência de escurecimento, com redução da luminosidade (L*) e das cores cromáticas (a* e b*).

Figura 06: Avaliação da cor instrumental de hambúrguer com e sem adição de gel de quitosana armazenado à -18°C por 120 dias.



^{abc} médias seguidas de letras iguais no mesmo tempo de armazenamento e na mesma análise em produtos diferentes não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

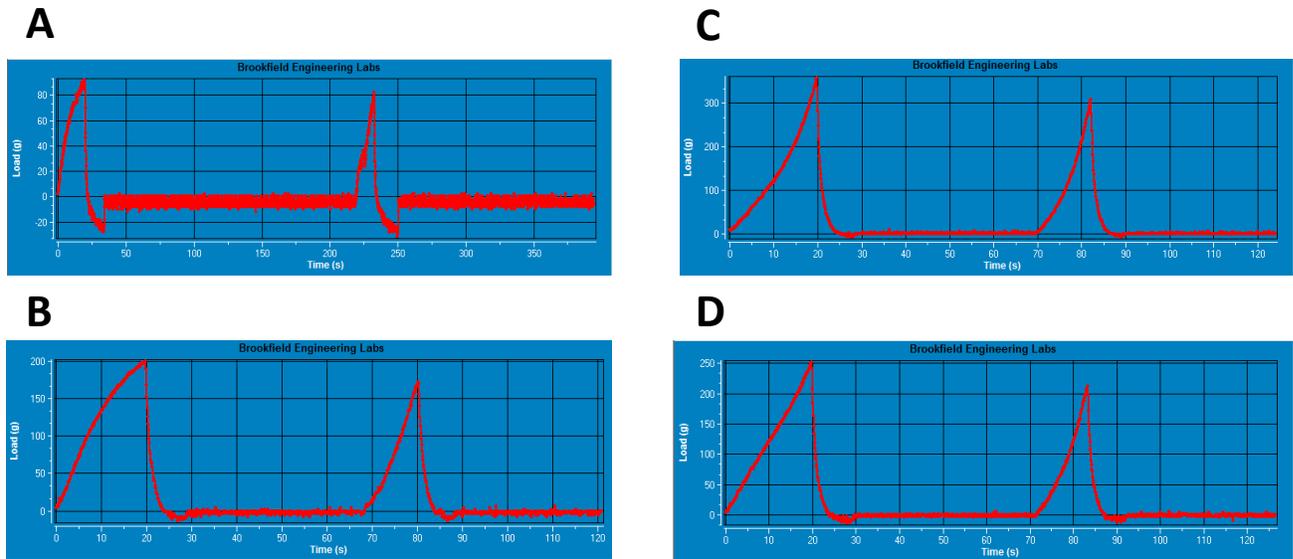
^{ABC} médias seguidas de letras iguais em tempos diferentes de armazenamento e na mesma análise e no mesmo produto não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2,5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Nas figuras 07 e 08 podemos observar os resultados da avaliação da textura instrumental. No tempo 0 a amostra H foi a que apresentou a maior média de força aplicada no teste de penetração (265gf), seguida pela amostra Q_{2.5}, C e Q_{5.0}, porém no final do armazenamento esta amostra apresentou a menor força aplicada, mostrando um amolecimento com o passar do tempo. Entre as amostras com adição do gel de quitosana, podemos observar o inverso, ou seja, as amostras mostraram-se mais consistentes. Este resultado pode ser atribuído a perda de umidade maior ocorrida nas amostras com quitosana.

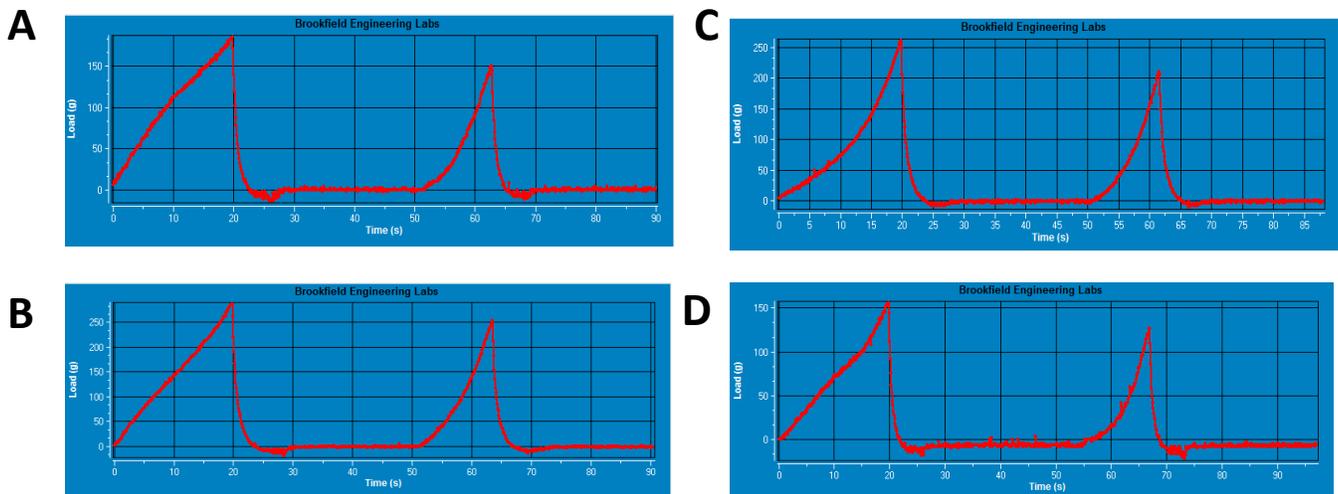
Na amostra com maior concentração do gel (5.0mg.mL⁻¹), a força aplicada no tempo 0 e no final do armazenamento foram 145gf e 235gf, respectivamente. Esses valores foram inferiores às forças aplicadas na amostra com menor concentração do gel (2.5mg.mL⁻¹), sendo estas 235gf (0dias) e 330gf (120dias).

Figura 07: Avaliação da textura instrumental de hambúrguer com e sem adição de gel de Quitosana à 25°C.



A (Hambúrguer Controle); B (Hamburguer Comercial); C (Hambúrguer com 2,5mg/mL⁻¹ de gel de quitosana) e D (Hambúrguer com 5.0mg/mL⁻¹ de gel de quitosana).

Figura 08: Avaliação da textura instrumental de hambúrguer com e sem adição de gel de quitosana armazenado à -18°C por 120 dias.



A (Hambúrguer Controle); B (Hamburguer Comercial); C (Hambúrguer com 2,5mg/mL⁻¹ de gel de quitosana) e D (Hambúrguer com 5.0mg/mL⁻¹ de gel de quitosana).

Na tabela 10 esta demonstrado o resultado da avaliação dos atributos sensoriais de aparência, cor, odor, sabor e textura.

Tabela 10: Média das notas dos julgadores aos atributos sensoriais de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120dias.

ATRIBUTOS	PRODUTOS	DIAS				
		1	30	60	90	120
APARENCIA	C	7,30±1,64Aa	6,70±1,86Aa	7,03±2,23Aa	7,67±0,99Aa	6,93±2,27Aa
	Q _{2.5}	7,53±1,61Aa	7,20±1,32Aa	7,53±1,59 Aa	7,0±1,74Aa	6,90±1,73Aa
	Q _{5.0}	7,33±1,93Aa	7,10±1,54Aa	7,20±1,47Aa	7,40±1,30Aa	6,80±2,14Aa
COR	C	7,33±1,65ABa	6,70±1,68Ba	7,10±1,94 ABa	7,90±1,03Aa	7,53±1,41ABa
	Q _{2.5}	7,77±1,61Aa	7,30±1,37Aa	7,53±1,45Aa	7,10±1,65Ab	7,40±1,79Aa
	Q _{5.0}	7,37±1,75Aa	7,40±1,43Aa	7,27±1,62 Aa	7,33±1,60Aab	7,07±1,85Aa
ODOR	C	6,93±1,76Aa	6,73±1,96Aa	7,43±1,54 Aa	7,57±1,36Aa	7,43±1,38Aa
	Q _{2.5}	7,10±1,75Ba	7,27±1,76ABa	7,97±0,89Aa	7,90±1,27ABa	7,17±1,55ABa
	Q _{5.0}	6,93±2,05Aa	7,50±1,50Aa	7,87±1,43Aa	7,33±1,62Aa	7,10±1,65Aa
SABOR	C	6,97±1,92ABa	6,30±2,04Bb	6,97±2,12ABa	7,43±1,38Aa	7,53±1,43Aa
	Q _{2.5}	6,43±2,31Ba	7,50±1,28Aa	7,33±1,62Aa	7,50±1,28Aa	7,33±1,42Aa
	Q _{5.0}	6,67±2,32ABa	7,27±1,53Aa	7,17±1,85ABa	7,00±1,51ABa	6,10±2,58Bb
TEXTURA	C	7,60±1,47Aa	6,90±1,81Aa	7,47±1,98Aa	7,63±1,10Aa	6,93±1,99Aa
	Q _{2.5}	6,40±2,44Bb	7,37±1,40Aa	7,60±1,65Aa	7,70±1,34Aa	7,20±1,73ABa
	Q _{5.0}	6,33±2,31Bb	7,40±1,57Aa	7,33±2,04Aba	6,83±1,70ABb	7,03±1,73ABa

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na VERTICAL não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na HORIZONTAL não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Onde: C= hambúrguer controle, Q_{2.5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Em relação a aparência não houve diferença significativa em todos os tempos entre as amostras, demonstrando que as mesmas se encontravam uniformes. Resultados positivos no quesito aparência, também foi encontrado por Dotto et al. (2008), ao avaliar a aplicação de filmes de quitosana em mamão. Han et al. (2004) e Park (1999) observaram a aplicação concomitante de quitosana em diferentes alimentos, e afirmaram que a presença deste antimicrobiano pode contribuir de forma eficiente na promoção do tempo de vida útil em frutas frescas, protegendo o produto de alterações deteriorantes, o que poderia ser responsável por alterações visuais.

No atributo cor, as amostras contendo gel de quitosana não apresentaram diferença significativa durante todo o período de armazenamento. A cor de um produto, segundo Osório, Osório & Sañudo (2009) é o primeiro atributo que o consumidor analisa no ato da compra, uma vez que a visão é o órgão responsável pela primeira sensação de aceitabilidade ou recusa. A partir desses dados, foi possível afirmar que houve uma estabilidade da cor das duas formulações com gel de quitosana.

Para o perfil sensorial de odor, os julgadores expressaram a mesma opinião, não observando nenhuma diferença perceptível entre o odor do produto controle e os que continham gel de quitosana. Botrel et al. (2007), ao utilizar a quitosana em alho minimamente processado também obteve resultado positivo quando recobriu o produto com o antimicrobiano. Outros resultados positivos foram relatados por Chien & Sheu & Lin (2007) com pitayas, e por Costa (2009) ao avaliar morangos revestidos à base de quitosana.

Na avaliação do atributo sabor, com exceção do tempo 30, não houve diferença significativa entre as amostras no decorrer do armazenamento, sendo a amostra Q_{5.0} a que recebeu as menores notas em todos os tempos. Esse fato pode ser atribuído a maior concentração de gel de quitosana presente nesta amostra, o que pode ter provocado um sabor residual decorrente da presença de ácido acético. Em estudo semelhante, Han et al. (2005) ao pesquisarem o emprego da quitosana no armazenamento de morangos, relataram adstringência e amargura no sabor das frutas, o que foi atribuído às soluções ácidas que são utilizadas para dissolução da quitosana. Em contrapartida, Matos (2000) obteve melhores resultados ao adicionar quitosana em bebida aguardente.

No atributo textura, na maior parte do armazenamento não houve diferença significativa entre as amostras, porém assim como no atributo sabor, a amostra Q_{5.0} recebeu as menores notas. A presença do gel de quitosana provavelmente causou um amolecimento da amostra, fato este

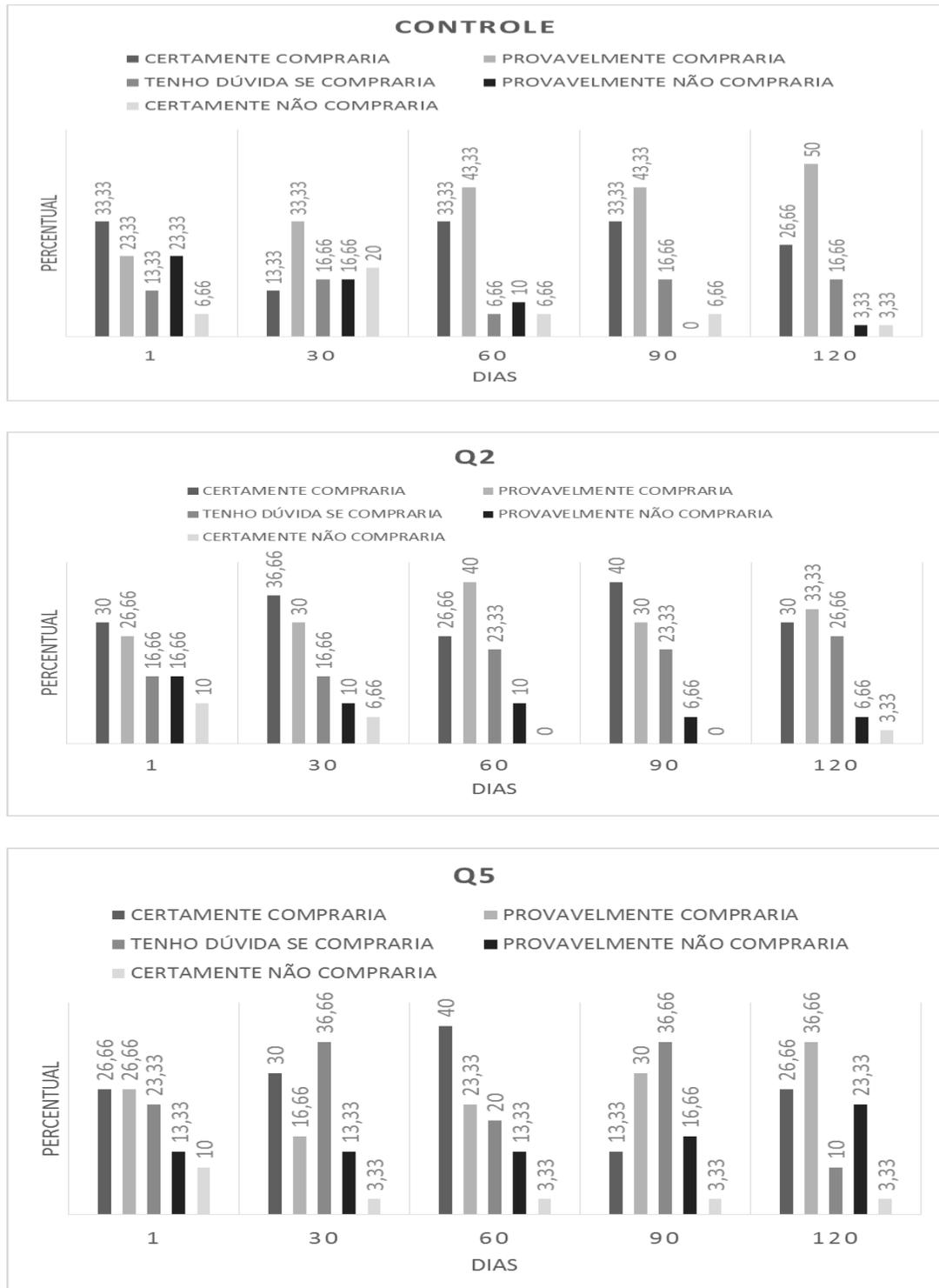
perceptível tanto na avaliação sensorial como na análise de textura instrumental, quando o Q_{5.0} apresentou as menores forças aplicadas para penetração. Resultados diferentes foram relatados por Damian (2005) ao estudar salsichas frankfurt, contendo quitosana, quando observou que as características sensoriais de textura não foram alteradas, quando comparado salsichas controle e com antimicrobiano, fato que pode ser justificado devido a quitosana ter sido incorporada como cobertura, e não adicionada junto ao alimento.

Ao avaliarmos o comportamento de cada amostra ao longo do tempo de armazenamento, observamos que a ausência de diferença significativa predominou, sendo o tempo 0 o que mais diferiu. Sugere-se com esse resultado que a inclusão do gel de quitosana foi mais percebido no tempo 0 por neste tempo as amostras não terem sido congeladas, atribuindo ao congelamento a função de melhoria na rigidez, adesão e homogeneidade, característicos do hambúrguer.

Ao avaliar de maneira global todos os atributos, amostra Q_{2.5} recebeu as melhores notas para todos os atributos avaliados (aparência, cor, odor, sabor e textura) e na maioria dos tempos analisados, o que torna essa concentração uma alternativa viável sensorialmente para uso em alimentos. Apesar disso, estudos com quitosana apontam como uma substância benéfica e segura para o consumo humano, por apresentar uma toxicidade menor do que a glicose ou sacarose. Em mamíferos a dose letal de glicose é da ordem de 8 a 12 gramas enquanto que 18 gramas de quitosana por quilograma de massa corporal não apresenta qualquer sinal de toxicidade ou mortalidade (CRAVEIRO et al.,1999; YADAV & BHISE, 2004).

Ao analisarmos a intenção de compra dos hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana, podemos verificar na figura 09 que os percentuais de julgadores que certamente comprariam e que provavelmente comprariam foram maiores em todos os tempos analisados para as amostras C e Q_{2.5}. Em contraposição ao visto em relação a amostra Q_{5.0}, quando os julgadores na sua maioria teriam dúvida se comprariam, provavelmente não comprariam ou certamente não comprariam. Esse comportamento dos julgadores corroborou com os resultados obtidos na análise dos atributos sensoriais, quando a amostra Q_{5.0} recebeu as menores notas, como também com o teste de ordenação de preferência mostrado na tabela 11, quando o Q_{2.5} foi a amostra preferida entre os julgadores.

Figura 09: Intenção de compra de hambúrgueres com e sem adição de quitosana armazenados à 18°C por 120 dias.



Onde: C= hambúrguer controle, Q_{2,5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Tabela 11: Soma das ordens de preferência de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120dias.

Tempo de armazenamento (dias)	Controle	Q _{2.5}	Q _{5.0}
0	59a	61a	60 ^a
30	73a	52b	55b
60	64a	57a	59 ^a
90	59b	50b	71 ^a
120	56a	57a	67 ^a

Valores seguidos de uma mesma letra, na horizontal, em formulações diferentes para um mesmo dia de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Friedman ao nível de 5% de probabilidade.

Evidências científicas também têm respaldado a inclusão da quitosana em alimentos, sem grandes alterações sensoriais, através de sua atuação como base na fabricação de suplementos nutricionais, emulsificantes, conservantes, fibras em biscoitos dietéticos, estabilizantes em alimentos em conservas, clarificantes de bebidas (SHAHIDI et al., 1999; BORGOGNI et al., 2006; LI et al., 2007; DAMIAN, 2005). Produtos de origem animal como bacalhau (SHAHIDI et al., 2002), carne de cordeiro (KANATT et al., 2004), salsicha (DAMIAN, 2005), mortadela (CHI et al., 2006), patê de carne (BENTO et al., 2011), são algumas pesquisas que reforçam a eficácia desse antimicrobiano natural com qualidade e aceitabilidade.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que quando contaminados por cepas patogênicas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*), os hambúrgueres adicionados de quitosana apresentaram uma redução maior da carga microbiana em comparação à hambúrgueres comerciais contendo aditivos químicos.

Evidenciou-se que a concentração de quitosana considerada ideal para a aplicação em hambúrguer bovino foi de 2.5mg/mL^{-1} , visto que esta mostrou-se igualmente eficaz à 5.0mg/mL^{-1} na inibição do crescimento do *S. aureus* e *L. monocytogenes*, e apresentou resultados satisfatórios na físico-química e aceitação sensorial, durante o período de 120 dias de armazenamento à temperatura de -18°C .

Dessa forma a quitosana pode ser considerada uma alternativa viável na preservação de alimentos, podendo ser utilizada como conservante natural em hambúrguer. Este estudo contribui de forma significativa não somente para comunidade científica, mas também para as indústrias de produtos cárneos, uma vez que o importante achado da utilização de quitosana pode auxiliar no controle destes patógenos de maneira saudável, segura e saborosa, isto é, do ponto de vista nutricional, microbiológico e sensorial, respectivamente.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira Da Indústria Exportadora De Carne Bovina. Disponível em: <
http://www.abiec.com.br/news_view.asp?id=%7BB1E833B1-FC27-4F70-8F0D-913D8E976DFA%7D > Acesso em 10 dez. 2015.
- ADAK, G.K., MEAKINS, S.M., YIP, H., LOPMAN, B.A. & O'BRIEN. S.J. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerging Infectious Disease*, v. 113, p.65-372, mar. 2005.
- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT – Food Science and Technology*, v.43, p.837-842, 2010.
- AKUTSU, R.C.C.A., BOTELHO, R.B.A., CAMARGO, E.B., OLIVEIRA, K.E.S. & ARAÚJO, W.M.C. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. *Revista de Nutrição* 3, 419-27, 2005.
- ALMEIDA, A.A.P. & SILVA, P.H.F. - *Qualidade em dia*, 5, p.5. 1998.
- ALTIERI, C., SCROCCO, C., SINIGAGLIA, M.M. & DEL NOBILE, M.A. *Journal of Dairy Science*, 88, p.2683. 2005.
- ALVES M.G. & UENO M. Restaurantes self-service: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. *Revista de Nutrição. Campinas*, v.23, n.4, p.573-580, jul/ ago. 2010.
- AMORIM, R.V.S., CAMPOS-TAKAKI, G.M., LEDINGHAM, W.M. & FUKUSHIMA, K. Screening of chitin deacetylase from Mucoralean strains (*Zygomycetes*) and its relationship to cell growth rate deacetylase from Mucoralean strains (*Zygomycetes*) and its relationship to cell growth rate. *Journal of Industrial and Microbial Biotechnology*, 31, 19-23, 2005.
- AMORIM, R.V.S., PEDROSA, R.P., FUKUSHIMA, K., MARTÍNEZ, C.R., LEDINGHAM, W.M. & CAMPOS-TAKAKI, G.M.. Alternative Carbon Sources from Sugar Cane Process for Submerged Cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to Produce Chitosan. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 519–523, 2006.
- AMORIM, R.V.S., SOUZA, W., FUKUSHIMA, K. & CAMPOS-TAKAKI, G.M. Faster chitosan production by mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 20-23, 2000.

- ANDRADE, V.S., NETO, B.B., FUKUSHIMA, K. & CAMPOS-TAKAKI, G.M. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 20, 49-153,
- AOAC, Association Of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry Internacional 16 ed., 1995.
- AOAC, Association Of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry Internacional. 17th edition, v.2. 98529 (45.4.07), 2002a.
- AOAC, Association Of Official Analytical Chemistry. Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry Internacional. Cap.44 (900.02), 1996.
- ASSIS, O.B.G. & LEONI, A.M. Filmes comestíveis de quitosana. *Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Uberlândia, n. 30, p.33-38, 2003.
- AVADI, M.R., SADEGHI, A.M.M., TAHZIBI, A., BAYATI, K.H., POULADZADEH, M., ZOHURIAAN-MEHR, M.J. & RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as an antimicrobial agent: Synthesis, characterization and antibacterial effects *European polymer journal*, 40, P.1355-1361. 2004.
- AZEVEDO, V.V.C., CHAVES, S.A., BEZERRA, D.C., LIA FOOK, M.V. & COSTA, A.C.F.M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, Campina Grande, v.2, n.3, p. 27-34, dez. 2007.
- BARBALHO, T.C.F., ALMEIDA, P.F., ALMEIDA, R.C.C. & HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. *Food control*, 16, P.211-216. 2005.
- BARROS, M.A.F., NERO, L.A., MANOEL, A.V.B., OVÍDIO, L., SILVA, L.C., FRANCO, B.D.G.M. & BELOTI, V. *Listeria* spp associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 603-609, 2007.
- BAUTISTA-BAÑOS, S., HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M., BOSQUEZ-MOLINA, E. & WILSON, C. L. – *Crop Protection*, 22(9), P.1087-1092. 2003.
- BENKERROUM, N., DAOUDI, A., HAMRAOUI, T., GRALFI, H., THIRY, C., DUROY, M., EYRART, P. & ROBLAIN, D. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *Journal of applied microbiology*, 98, P.56-63. 2005.

- BENTO, R.A., SOUZA, E.L., STAMFORD, T.L.M. & STAMFORD, T.C.M. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.10, n.5, p. 260 – 274, set. 2009.
- BENTO, R.A., STAMFORD, T.L.M., CAMPOS-TAKAKI, G.M., STAMFORD, T.C.M. & SOUZA, E.L. Potential of chitosan from *Mucorrouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 583-589, 2009.
- BENTO, R.A., STAMFORD T.L.M., STAMFORD, T.C.M., ANDRADE, S.A.C. & SOUZA, E.L. Sensory evaluation and inhibition of *Listeria monocytogenes* in bovine pâté added of chitosan from *Mucorrouxii*. *Food Science and Technology*, v. 44, n.2, p. 588-591, mar. 2011.
- BERESFORD, M.R, ANDREW, P.W. & SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of applied microbiology*, 90, P.1000-1005. 2001.
- BERGER, L.R.R., STAMFORD, T.C.M., STAMFORD-ARNAUD, M., FRANCO, L.O., NASCIMENTO, A.E., CAVALCANTE, H.M.M., MACEDO, R.O. & CAMPOS-TAKAKI, G.M. Effect of Corn Steep Liquor (CSL) and Cassava Wastewater (CW) on Chitin and Chitosan Production by *Cunninghamella elegans* and Their Physicochemical Characteristics and Cytotoxicity. *Molecules*. v19, 2771-2792. 2014a.
- BERGER, L.R.R, STAMFORD, T.C.M, STAMFORD-ARNAUD, T.M., ALCÂNTARA, S.R.C., SILVA, A.C., SILVA, A.M., NASCIMENTO, A.E. & CAMPOS-TAKAKI, G.M.C. Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. *Int. J. Mol. Sci.* V15, 9082-9102. 2014b.
- BEVERLYA, R.L., JANES, M.E., PRINYAWIWATKULA, W. & NO, H.K. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 25: 534-537. 2008.
- BLAIOTTA, G., ERCOLINI, D., PENNACCHIA, C., FUSCO, V., CASABURI, A., PEPE, O. & VILLANIET, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp strain isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seg and sei in *S. aureus* AB-8802. *Journal of Applied Microbiology*, v.97, p. 719-730, 2004.
- BORDERÍAS, A.J., SÁNCHEZ-ALONZO, I. & PÉREZ-MATEOS, M. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends in Food Science e Technology*, v. 16, p. 458-465. 2005.

- BORGES, M.F., ARCURI, E.F., PEREIRA, J.L., FEITOSA, T. & KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. B.CEPPA, Curitiba v. 26, n. 1, p. 71-86 jan./jun. 2008.
- BORGOGNI, C.F., POLAKIEWICZ, B., PITOMBO, R.N.M. Estabilidade de emulsões de D-limoneno em quitosana modificada. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.3, p. 502-508. 2006.
- BOSTAN, K. & MAHAN, F.I. Microbiological quality and shelf-life of sausage treated with chitosan. *J. fac. Vet. Med. Istanbul Univ.*, v. 37, n. 2, p. 117-126, 2011.
- BOTREL, D.A. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. *Revista de Ciência e Tecnologia Alimentar*, v.27, n.1, p.32-38, 2007.
- BRAGA, L.C., SHUPP, J.W., CUMMINGS, C., JETT, M., TAKAHASHI, J.A., CARMO, L.S., CHARTONE-SOUZA, E & NASCIMENTO, A.M. Pomegrate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 335-339, 2005.
- BRANDÃO, J. L. Monitoramento microbiológico em uma linha de abate de bovinos mediante o emprego de micro-organismos indicadores de higiene e pesquisa de patógenos de importância em saúde pública. Dissertação (mestrado). Paraná, Brasil. 2011.
- BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758 >. Acesso em: 01 agosto 2014).
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N.12, de 2 de Janeiro de 2001. Diário Oficial da união, Brasília, 10/01/2001.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Ministério da agricultura e do abastecimento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Hambúrguer. Brasília, 2000. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br> >. Acesso em: 05 abr. 2012.
- BUZBY, J.C. Older adults at risk of complications from microbial food borne illness. *Food Review*, v.25, n.2, p. 30-35, 2002.
- CÂMARA, S.A.V. Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, 1998-2001. 79 f. (Especialização) - Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, Campo Grande, 2002.

- CAMPOS-TAKAKI, G.M. The fungal versatility on the copolymers chitin and chitosan production, in: Chitin and chitosan opportunities and challenges, Dutta, P. K. (ed.), SSM: International Publications, Índia. 2005.
- CARMO, G.M.I., OLIVEIRA, A.A., DIMECH, C.P., SANTOS, D.A., ALMEIDA, M.G., BERTO, L.H., ALVES, R.M.S. & CARMO, E.H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999-2004. Brasília, Dezembro, 2005.
- CASSARIN, L. S. Sobrevivência de Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Salmonella Enteridis durante o Armazenamento de hambúrguer de frango congelado. 75p. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente – microbiologia de alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Março, 2005.
- CASSIN, M.H., LAMMERDING, A.M., TODD, E.C.D., ROSS, W. & MCCOLL, R.S. Quantitative risk assessment for Escherichia coli O157:H7 in ground beef hamburgers. International Journal of Food Microbiology, v. 41, p. 21-44, 1998.
- CASTRO, M.M.M.V. & IARIA, S.T. Staphylococcus aureus enterotoxigênico no vestíbulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa, PB. Revista de Saúde Pública, v. 18, p. 235-245, 1984.
- CATÃO, R.M.R. & CEBALLOS, B.S.O. Listeria spp., coliformes totais e fecais e E. coli no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21(3), p.281-287. 2001.
- CAYE, L., FRANÇOIS P., SANTOS M.V., LIZIANY MEDEIROS M. & PIRES C.C. Hambúrguer de carne ovina: aceitabilidade do consumidor. In: Anais do III SEMINÁRIO: SISTEMAS DE PRODUÇÃO AGROPECUÁRIA – Ciência e tecnologia de alimentos, UFTPR – Campus Dois Vizinhos, 2009.
- CÉ, N. Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de kiwis morangos minimamente processados. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2009.
- CHI, S., ZIVANOVIC, S. & PENFIELD, M. P. Application of chitosan films with oregano essential oil on bologna- active compounds and sensory attributes. Food Science and Technology International.v. 12, n.2, p. 111-117, abr. 2006.

- CHIEN, P.J., SHEU, F. & LIN, H.R. Quality assessment of low molecular weight chitosan coating on sliced red pitayas. *Journal of Food Engineering*, v.79, n.2, p.736-740, 2007.
- CHUNG, Y.-C. & CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 8, p. 2806-2814, 2008.
- CHUNG, Y-C., SU, Y-A., CHEN, C-C., JIA, G., WANG, H-L., WU, J.C.G. & LIN, J.G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 25, n. 7, p.932-936, jul. 2004.
- COMA, V., MARTIAL-GROS, A., GARREAU, S., COPINET, A., SALIN, F. & DESCHAMPS, A. Edible antimicrobial films base on chitosan matrix. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 3, p. 1162-1169, abr. 2002.
- COSTA SILVA, H.S.R.; SANTOS, K.S.C.R. & FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Quim. Nova*, 29(4), p.776-785. 2006.
- COSTA, A.C.S., ROMAN, J.A., VIEIRA, R.F., MEIER, T.R.W. & LOBO, V.A.S. Análise sensorial e de aceitação de patê de Fígado enriquecido com orégano. In: Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica, 2. Anais do II ENDICT, Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR, Toledo, 20 a 22 de Outubro de 2010. Disponível em <www.utfpr.edu.br/Toledo> Acessado em: 05 de julho de 2012.
- COSTA, F.B. Fisiologia e conservação de cultivares de morangos inteiros e minimamente processados. Tese - (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, MG, 2009.
- CRAVEIRO, A. A., CRAVEIRO, A.C. & QUEIROZ, D.C. Quitosana: A fibra do futuro. PADETEC – Parque de Desenvolvimento Tecnológico, Fortaleza, 1999, cap. 3.
- CRUZ, C.D., SILVESTRE, F.A., KINOSHITA, E.M., LANDGRAF, M., FRANCO, B.D.G.M. & DESTRO, M.T. Epidemiological Survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 375-383, 2008.
- DAMIAN, C. Efeito da quitosana na digestibilidade aparente da gordura e na qualidade de salsichas Frankfurt. 154f. Tese - (Doutorado em Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- DARMADJI, P. & IZUMINOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, v. 38, n. 2, p. 243-254, 1994.

- DEDIOL, C., NACIF, N.J., ANDRÉ, S., SÁNCHEZ, M.L., ACOSTA, M.V. & SFREDDO, S.E. Incidência de *Listeria monocytogenes* en carne vacuna fresca en el Área del Gran Mendoza. *Higiene Alimentar*, v.16, n.102/103, p.13-16, 2002.
- DEVLIEGHERE, F., VERMEULEN, A. & DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, v.21, n. 6, p. 703–714, ago. 2004.
- DOTTO, G., GREVINELI, A., OLIVEIRA, A., PONS, G. & PINTO, L. Uso de quitosana como filme microbiológico para o aumento da vida útil de mamões papaia. Escola de Química e Alimentos – Núcleo de Engenharia de Alimentos – Rio Grande-RS 2008. XVII Congresso de Iniciação Científica.
- DUTTA, J., TRIPATHI, S. & DUTTA, P. K. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligossacarides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*, v. 18, n. 1, p. 3-34, 2011.
- EICHHOLZER, M. & GUTZWILLER, F. Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 4, p.95-105, abr. 1998.
- EL GHAOUTH, A., ARUL, J., PONNAMAPALAM, R. & BOULET, M. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science*, 56(6), p.1618-1620. 1991.
- EL GHAOUTH, A., ARUL, J., WILSON, C. & BENHAMOU, N. Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 12(2), p.183-194. 1997.
- FAI, A.E.C., STAMFORD, T.C.M. & STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.9, n.5, p.435-451, abr. 2008.
- FAI, A.E.C., STAMFORD, T.C.M., STAMFORD-ARNAUD, T.M., SANTA-CRUZ, P.D., DA SILVA, M.C.F., CAMPOS-TAKAKI, G.M. & STAMFORD, T.L.M. Physico-Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. *Molecules*, 16, 7143-7154. 2011.
- FATTORI, F.F.A, SOUZA, L.C., BRAIOS, A., RAMOS, A.P.D., TASHIMA, N.T., NEVES, T.R.M. & BARBOSA, R.L. Aspectos sanitários em “trailers” de lanche no município de Presidente Prudente, SP. *Revista Higiene Alimentar*. v.19, p. 54-62, jan/fev. 2005.

- FDA. "CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION; USDA/ FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION". Draft Assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponível em: <http://www.foodsafety.gov> e <http://www.cfsan.fda.gov>, consulta em 21 de janeiro de 2014.
- FELLOWS, P.J. Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Práticas. 2ª ed. Porto Alegre (Brasil): Artmed.p. 19-22. 2006.
- FERREIRA, F.C, SANTOS, N.N. & MEDEIROS, L.M. Vida de prateleira de hambúrguer: avaliação físico-química com relação ao ranço. Hig. aliment;15(86):61-4, jun. 2001.
- FIGUEIREDO, J.F.D. Compósitos hidroxiapatita: Quitosana. Preparação, caracterização e aspectos físico-químicos. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. 69p. 2002.
- FORTUNA, J.L. & FRANCO, R.M. Uma revisão sobre o *Clostridium perfringens* como agente etiológico de doenças transmitidas por alimentos (D.T.A.). Revista Higiene Alimentar, v.19, n. 131, p. 48-54, 2005.
- FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 182 p. 1996.
- FRANCO, L.O., STAMFORD, T.C.M., STAMFORD, N.P. & CAMPOS-TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. Rev. Analyt, 3(10):40-44. 2005.
- GARCIA, B.M. Factores que influncianlasupervivencia y lamultiplication de los microorganismos em los alimentos. Alimentaria, v.96, p. 47-49, 1996.
- GARCÍA, M.L., DOMINGUEZ, R., GALVEZ, M.D., CASAS, C. & SELGAS, M.D. Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented. Meat Science, v.60, n. 3, p. 227-236, mar. 2002.
- GERMANO, M.I.S. & GERMANO, P.M.L. Higiene e Vigilância Sanitária dos Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 629p.
- GERMANO, M.I.S., GERMANO, P.M.L., CASTRO, A.P., ANDRIGHETO, C., BABADOPULOS, P., KOSHIO, S., PEDRO, S.C.M. & COLOMBARI, V. Comidas de ruas: pros e contras. Revista Higiene Alimentar, v.14, n. 77, p. 27-33, out. 2000.

- GOKALP, H. Y., OCKERMAN, H. W. & PLIMPTON, R. F. Effect of different packaging on objective quality characteristics of frozen and stored cow beef. *Journal of Food Science*, v.43, p. 297-300, 1978.
- GOUNADAKI, A.S., SKANDAMIS, P.N., DROSINOS, E.H. & NYCHAS G.J.E. Effect of packaging on the survival of *Listeria monocytogenes* on sliced salami. *J. Food Prot.* v.70, p.2313–2320, 2007.
- HAN, C., LEDERER, C., MCDANIEL, M. & ZHAO, Y. Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. *J. Food Sci.* v.70, p.172-178, 2005.
- HAN, C., ZHAO, Y., LEONARD, S.W. & TRABER, M.G. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.33, p.67–78, 2004.
- HELANDER, I.M., NURMIAHO-LASSILA, E.L., AHVENAINEN, R., RHOADES, J. & ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Int J Food Microbiol.* V.71, p.235–244, 2001.
- HILL, M. J. Nitrate toxicity: myth or reality. *British Journal of Nutrition*, v. 81, n.5, p. 343-344, maio. 1999.
- HIRAI, A., ODANI, H. & NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy *Polymer Bulletin.* 26: p.87-94. 1991.
- HIRSCHBRUCH, M.D.; TORRES, E.A.F.S.; ROVIELO, A. & RABAY, A. Natural X Seguro: Compilação de substâncias tóxicas naturalmente presentes nos alimentos. *Higiene Alimentar*, v. 13, n. 62, p. 28-33, Jun., 1999.
- HUGGINS, M.L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules: IV. Dependence on concentration. *Journal of the American Chemistry Society*, v.64, p.2716-2718, 1942.
- IARA, S.T., FURLANETTO, S.M.P. & CAMPOS, M.L.C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. *Revista de Saúde Pública*, v. 14, p. 93-100, 1980.
- IGENE, J.O., PEARSON, A.M., MERKEL, R.A. & COLEMAN, T.H. Effect of frozen storage time, cooking and holding temperature upon extractable lipids and TBA values of beef and chicken. *Journal of Animal Science*, v. 49, n. 3, p. 701-707, 1979.

- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 317p.
- JARRAUD, S., PEYRAT, M.A., LIM, A., TRISTAN.A., BÈS, M., MOUGEL, C., ETIENNE, J., VANDENESCH, F., BONNEVILLE & M., LINA, G. Egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology*, v.166, n.1, p. 669-677, jan. 2001.
- JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005. p.711.
- JE, J.Y. & KIM, S.K. Chitosan Derivatives Killed Bacteria by Disrupting the Outer and Inner Membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p.6629-6633, 2006.
- JERÔNIMO, H.M. A., BARBOSA, I.M., COSTA, A.C.V., QUEIROGA, R.C.R.E., SOUZA, E.L. & CONCEICAO, M.L. Ocorrência de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* em superfícies de preparo de alimentos em unidades de alimentação e nutrição. *Nutrire*, São Paulo, v. 36, p. 37-48, 2011.
- JIANG, Y. & LI, Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, 73(2), p.139-143. 2001.
- KAFETZOULOS, D., MARTINOV, A. & BOURIOTIS, V. Em *Chitin Enzymology*; Muzzarelli, R. A. A., ed., European Chitin Soc: Ancona, 1993, p. 147.
- KANATT, S.R., CHANDER, R. & SHARMA, A. Effect of irradiated chitosan on the rancidity of radiation-processed lamb meat. *International Journal of Food Science and Technology*, v.39, p. 997-1003. 2004.
- KANATT, S., CHANDER, R. & SHARMA, A. Chitosan and mint mixture: a new perspective for meat and meat products. *Food Chemical*, v. 107, p. 845-852, 2008.
- KASNOWSKI, M.C. *Listeria* ssp., *Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. Dissertação de Mestrado. Brasil. Universidade Federal Fluminense, 2004.
- KASAAI, M.R., ARUL, J. & CHARLET, G. Intrinsic Viscosity-Molecular Weight Relationship for Chitosan. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 38, 2591-2598. 2000.
- KIM, C. & CHOI, K.S. Synthesis and properties of carboxylkyl chitosan derivatives. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v.4, n. 1, p. 19-25, 1998.

- KONG, M., CHEN, X.G., XING, K. & PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art view. *International Journal of Food Microbiology*, v.144, p.51–63, 2010.
- KUBOTA, N., TATSUMOTO, N., SANO, T. & TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydrate Research*. v. 324, n. 4, p. 268-274, mar. 2000.
- LANCIOTTI, R., GIANOTTI, A., PATRIGNANI, N., BELLETI, N., GUERZONI, M.E. & GARDINI, F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 3-4, p. 201-208, 2004.
- LAVERTU, M., XIA, Z., SERREQUI, A.N. et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of desacetylations of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32, 1149-1158. 2003.
- LE LOIR, Y., BARON, F. & GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, v. 2, n.1, p. 63-76, mar. 2003.
- LEONARDI, D.S.; FERES, M.B.C.; PORTARI, G.V.; JORDÃO, A.A. Determinação do valor energético de hambúrgueres e almôndegas através da calorimetria direta e da composição centesimal. Comparação com informações nutricionais apresentadas nas embalagens. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 141-148, Sept./Oct. 2009.
- LEVRÈ, E., VALENTINI, P. & CHIAVERINI, F. Presenza di E. coli O157 verocitotossigeni in hamburgerdi carne bovina. *Annali di igiene: medicina preventiva e di comunità*.v.12, n. 2, p. 131-137, mar/abr. 2000.
- LI, Y., CHEN, X.G., LIU, N., LIU, C.S., LIU, C.G., MENG, X.H., YU, L.J. & KENENDY, J.F. Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 227-232, 2007.
- LIMA, J.X. & OLIVEIRA, L.F. O crescimento do restaurante self-service: aspectos positivos e negativos para o consumidor. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v.19, p.45-53, mar. 2005.
- LIMA, J.R. Caracterização físico-química e sensorial de hambúrguer vegetal elaborado à base de caju. *Ciênc. agrotec. (Impr.)*;32(1):191-195, jan.-fev. 2008.
- LINDQVIST, R., ANDERSSON, Y., LINDBÄCK, J., WEGSCHEIDER, M., ERIKSSON, Y., TIDESTRÖM, L., LAGERQVIST-WIDH, A., HEDLUND, K.O., LÖFDAHL, S., SVENSSON,

- L. & NORINDER, A. A one-year study of food borne illnesses in the municipality of Uppsala. *Emerging Infectious Diseases*, Sweden, v.7, p. 588-592, 2001.
- LIU, J., ZHANG, J. & XIA, W. Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food Chem* 107: 419-425. 2004.
- LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, v.56 (2), p.105-115. 2000.
- MACHADO, M. M. Efeito do congelamento e estocagem sobre a qualidade da carne bovina. 41f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária)- Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.
- MARCHI, P.G.F. Estudo comparativo do estado de conservação de carne moída através de métodos microbiológicos e físico-químicos. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2006.
- MARIANO, C.O. Efeitos da radiação gama na conservação da carne bovina refrigerada. 76 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura CENA, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- MARQUES, J.M. Elaboração de um produto de carne bovina “tipo hambúrguer” adicionado de farinha de aveia. 55f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná Curitiba, 2007.
- MARTÍN, B., JOFRÉ, A., GARRIGA, M., HUGAS, M. & AYMERICH, T. *Journal of Applied Microbiology*, 39(3), p.290. 2004.
- MATHUR, N.K. & NARANG, C.K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal of Chemical Education*, v.67, p.938-942, nov. 1990.
- MATOS, J.H.G. Utilização de Biopolímeros Quitina e Quitosana, Derivados de Caranguejo-uça (*Ucides cordatus*) na redução de Cobre Contaminante da Aguardente Aguardente de Cana. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, 2000.
- MCCABE-SELLERS, B.J. & BEATTIE, S.E. Food safety: emerging trends in food borne illness surveillance and prevention. *Journal of the American Dietetic Association*. v.104, n.1, p.1708-1717, nov. 2004.
- MCCORMICK, K.E., HAN, I.Y., ACTON, J.C., SHELDON, B.W. & DAWSON, N.P.L. In-package pasteurization combined with biocide impregnated films to inhibit *Listeria monocytogenes* and

- Salmonella typhimurium in Turkey Bologna. *Journal of Food Science*. v. 70, n. 1, p. 52-57, jan. 2005.
- MCLAUCHLIN, J. The relationship between listeria and listeriosis. *Food Control*, 7(4/5), p.187-193. 1996.
- MEAD, P.S., DUNNE, E.F., GRAVES, L., WIEDMANN, M., PATRICK, M., HUNTER, S., SALERI, E., MOSTASHARI, F., CRAIG, A., MSHAR, P., BANNERMAN, T., SAUDERS, B. D., HAYES, P., DEWITT, W., SPARLING, P., GRIFFIN, P., MORSE, D., SLUTSKER, L. & SWAMINATHAN, B. Nationwidw outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology and Infection*,134, p.744-751. 2006.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCAIG, L.F., BRESEE, J.S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M. & TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Disease*, v. 5, p.607-625 set/out. 1999.
- MEIRA, D.P. Produto tipo hambúrguer formulado com carne bovina e mandioca. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2013.
- MELO FILHO, A.B., BISCONTINI, T.M.B. & ANDRADE, S.A.C. Level nitrite and nitrate in sausages commercialized in metropolitan region of Recife. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. vol. 24, no. 3, pp. 390-392, 2004.
- MINIM, V.P.R. *Análise sensorial: Estudos com consumidores*. 3. Ed. Viçosa: UFV, 2013.
- MMWR/CDC-MORBIDITY MORTALITY WEEKLY REPORTS. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. *MMWR*, 38, p.267-268 (1989).
- MOREIRA, M.R., PONCE, A.G., DEL VALLE, C.E. & ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, *LWT. Food Science and Technology*, v.38, n. 5, p.565-570, ago. 2005.
- NASCIMENTO, M.G.F., OLIVEIRA, C.Z.F. & NASCIMENTO, E.R. Hambúrguer: evolução comercial e padrões microbiológicos. *Boletim do CEOOA*. Curitiba, v.23, n.1, p. 59-74, jan/Jun. 2005.
- NASCIMENTO, R.S. *Linguças frescais elaboradas com carne de avestruz: características bacteriológicas, físico-químicas e sensoriais*. 96 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2011.

- NO, H.K., MEYES, S.P., PRINYAWIWATKUL, W. & XU, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of Food Science*, 72(5), 87-100.
- NUNTHANID, J., PUTTIPIPATKHACHORN, S., YAMAMOTO, K. & Peck, E.G. Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan films. *Drug development and Industrial Pharmacy*, 2001; 27:143-157.
- OLIVEIRA, L.A.T., FERREIRA, T., FRANCO, R.M. & CARVALHO, J.C.A.P. Enumeração de *Escherichia coli* e *Enterococcus* em amostras de hambúrguer de frango, comercializado em Niterói – RJ. Avaliação da sensibilidade à antimicrobianos das cepas isoladas. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 13, n. 63, p. 49-55, jul/ago. 1999.
- OLIVO, R. Carne bovina e saúde humana. 332 ed. *Revista Nacional da Carne*, Outubro, 2004, p.332.
- OLSEN, S.J., MACKINON, L.C., GOULDING, J.S., BEAN, N.H. & SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks, United States, 1993-1997. *Morbidity and mortality weekly report*, v.49, p. 1-51, mar. 2000.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *Segurança básica para profissionais de saúde*. 1. ed. São Paulo: Manole, 2002.
- OSÓRIO, J.C.S., OSÓRIO, M.T.M. & SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p. 292-300, 2009.
- PALOMINO, J.-C., MARTIN, A., CAMACHO, M., GUERRA, H., SWINGS, J. & PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2720-2722. 2002.
- PARK, H.J. Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science and Technology*, Oxford, v.10, n. 8, p.254-260, 1999.
- PEARSON, A.M., LOVE, J.D. & SHORLAND, F.B. Warmed-overflavor in meat, poultry and fish. *Adv. Food Res.*, 23:1, 1977.
- PEDRO, A.S., CABRAL-ALBUQUERQUE, E., FERREIRA, D. & SARMENTO, B. Chitosan: na option for development of essencial oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate Polymers*, 76: 501-508. 2009.
- PETER, M.G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *J. M. S. Pure Applied Chemistry*, v. 32, p. 629-640, 1995.
- PIERSON, M. & CORLETT JR, D.A. *HACCP: principles and applications*. New York: Chapman & Hall, 1992. 212 p.

- Portaria, nº. 540, de 27 de outubro de 1997, Regulamento Técnico de Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego, Diário Oficial da União, Brasília, DF, (Brasil): Ministério da Saúde, 1997.
- PORTER, W.L., BLACK, E.D. & DROLET, A. M. Chitin and Chitosan as Novel Protective Food Ingredients. In: U.S Army Natick RD&E Center, Natick, MA, Marine Polymer Technologies, Danvers, MA, 2000.
- QUIN, C., LI, H., XIAO, Q., LIU, Y., ZHU, J. & YUMIN, D. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, n. 3, p. 367- 374, mar. 2006.
- QUINN, P.J. – *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*, ARTMED, Porto Alegre. 2005.
- RAAFAT, D., BARGEN, K., HASS, A. & SAHL, H. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 12, p. 3764-3773, 2008.
- RAUHA, J.P., REMES, S., HEINONEN, M., HOPIA, A., KÄHKÖNEN, M., KUJALA, T., PIHLOJA, K., VUORELA, H. & VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 3-12, maio. 2000.
- RHOADES, J. & ROLLER, S. Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n.1, p. 80-86, jan. 2000.
- ROBERTS, G.A.F. *Chitin Chemistry*. ed, MacMillan Press Ltd: London, 1992.
- ROCA, R.O. *Modificações post-mortem*. Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. UNESP - Campus de Botucatu. 2001.
- RODRÍGUEZ, M.M., BERTIN, B.M.A.& ASSIS, L. Índícios de Rotavírus na etiologia de um surto de infecção de origem alimentar. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, n.24, p. 88-93, jan/ mar. 2004.
- RODRÍGUEZ, M.S., CENTURIÓN, M.E. & AGULLÓ, E. Chitosan-yeast interaction in cooked food: influence of the Maillard reaction. *Journal of Food Science* v. 67, p. 2576-2578. 2002.
- ROMANAZZI, G., NIGRO, F. & IPPOLITO, A. Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*, 29(1), p.73-80. 2003.

- ROMANAZZI, G., NIGRO, F., IPPOLITO, A., VENERE, D. DI & SALERNO, M. Effects of Pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Food Microbiology and Safety*, 67(5), p.1862-1865. 2002.
- ROMANELLI, P.F., CASERI, R. & LOPES FILHO, J.F. Processamento da Carne de Jacaré do Pantanal (*Caiman crocodilus yacare*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 1, p. 70-5, 2002.
- SAGOO, S.K., BOARD, R. & ROLLER, S. Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts. *Letters in Applied Microbiology*, v.34, p.168- 172, dez. 2002.
- SAKATE, R.I., ARAGON, L.C., RAGHIANTE, F., LANDGRAF, M., FRANCO, B.D.G.M. & DESTRO, M.T. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo.- *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 53(2). P.184-187. 2003.
- SAMUEL, C.M., VUGIA, D.J., KOEHLER, K.M., MARCUS, R., DENNEN, V., DAMASKE, B., SHIFERA, W. B., HADLER, J., HENAO, O.L. & ÂNGULO, F.J. Consumption of risky foods among adults at high risk for severe food borne diseases: room for improved targeted prevention messages. *Journal of Food Safety*, v.27, n. 2, p. 219- 232, maio. 2007.
- SANTOS, J.E., SOARES, J.P., DOCKAL, E.R. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens de polímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, p.242-249, 2003.
- SGARBIERI, V.C. Alimentação e Nutrição – fator de saúde e desenvolvimento. Campinas, Ed. UNICAMP; São Paulo: Almed, 1987. 387 p.
- SHAHIDI, F., KAMIL, J., JEON, Y.J. & KIM, S.K. Antioxidant role of chitosan in a cooked cod (*GadusMorhua*) model system. *Journal of Food Lipids*, v.9, n.1, p.57-65, mar. 2002.
- SHIGEMASA, Y., MATSURA, H., SASHIVA, H. & SAIMOTO, H. An improved IR spectroscopic determination of degree of deacetylation of hitin, in *Advances in Chitin Science*, Vol I, ed by Domard A, Jeuniau C, Muzzarelli RAA and Roberts G, Jacques Andre´ Publishers, Lyon, France. 1996; pp 204–209.
- SHINOHARA, N.K.S., BARROS, V.B., JIMENEZ, S.M.C., MACHADO, E.C.L., DUTRA, R.A.F. & LIMA, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p.1669-1674. out. 2008.
- SIGNINI, R. & CAMPANA FILHO, S.P. Purificação e Caracterização de Quitosana Comercial. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, 1998.

- SIGNINI, R.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. *Carbohydrate Polymers*, v. 43, p.351-357, 2000.
- SILVA, H.S.R.C., SANTOS, K.S.C.R. & FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p.776-785, mar. 2006.
- SILVA, M.C.F., STAMFORD, T.C.M., FRANCO, L.O.F. & CAMPOS-TAKAKI, G.M. Effect of salinity and glucose on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans*. *Asian Journal of Chitin*, 2, 29-38, 2006.
- SOBREIRO, L.G. & SOUZA, E.R. Avaliação físico-química e organoléptica do estado de conservação de carne bovina moída, preparada industrialmente. *Revista Brasileira Ciência Veterinária*, Niterói, v.3, n.3, p.99-104, 1996.
- SORIANO, J.M., FONT, G., RICO, H., MOLTO, J.C. & MANES, J. Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in foods. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 5, p.857-860, maio. 2002.
- SOUSA, E.P., MORI, E., LEMOS, D.M. & SOUSA, F.C. Análise química da formulação de hambúrguer enriquecido com fibras da casca de melancia desidratadas. *Revista verde*, Mossoró, v.7, n.1, p. 96 – 101, jan. 2012.
- SPENCER, E.H., FRANK, E. & MCINTOSH, N.F. Potential effects of the next 100 billion hamburgers sold by McDonald's. *American Journal of Preventive Medicine*. San Diego, v. 28, n. 4, p.379-381, maio. 2005.
- STAMFORD, T.C.M., STAMFORD, T.L.M., STAMFORD, N.P., NETO, B.B. & CAMPOS-TAKAKI, G.M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. 10, 8-2007.
- STAMFORD, T.C.M., STAMFORD-ARNAUD, T.M., CAVALCANTE, H.M.M, MACEDO, R.O. & CAMPOS-TAKAKI, G.M. Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent. Cap 9. P.229-244. 2013.
- STAMFORD-ARNAUD, T.M. & STAMFORD, T.C.M. Caracterização da quitosana e sua aplicação na nanotecnologia. Cap 6 p.733-761. In: *Biotecnologia aplicada à agricultura: Textos de apoio e protocolos experimentais*. Editores FIGUEIREDO MVB; BURITY HA OLIVEIRA JP; SANTOS CERS; STAMFORD NP. Embrapa Informação Tecnológica; Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), p.761, 2010.

- STAMFORD-ARNAUD, T.M. Preparação, caracterização e aplicação de nanocompósitos de quitosana/quantum dots fluorescentes. 183f. Tese - (Doutorado em Ciências dos Materiais) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- STEVENS, M.P. Polymer chemistry: an introduction. 3th ed. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- STIKA, J.F., XIONG, Y.L. & SUMAN, S.P. Frozen storage stability of antioxidant-treated raw restructured beef steaks made from mature cows. *Meat Science*, v. 7, n.4, p. 562-569. dez. 2007.
- SYNOWIECKI, J. & AL-KHATTEB, N.A.A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.v.43, n. 2, p.144-171, 2003.
- TACO, Tabela Brasileira de Composição de alimentos/ NEPA- UNICAMP – Versão IV. Campinas: NEPA- UNICAMP, P.105, 2011.
- TALAMINI, E., PEDROZO, E. A. & SILVA, A. L. Gestão da cadeia de suprimentos e a segurança do alimento: uma pesquisa exploratória na cadeia exportadora de carne suína - *Gestão & Produção*, 12(1). 2005.
- TAVARES, R.S., CRUZI, A.G., OLIVEIRA, T.S., BRAGA, A.R., REIS, F.A., HORA, I.M.C., TEIXEIRA, R.C. & FERREIRA, E.F. Processamento e aceitação sensorial do hambúrguer de coelho (*Orytolagus cunicullus*). *Ciênc. Tecnol. Aliment*, Campinas, 27(3): 633-636, jul.-set. 2007.
- TAVARES, T.M. & SERAFINI, A.B. Avaliação microbiológica de hambúrgueres de carne bovina comercializados em sanduicherias tipo “trailers” em Goiânia. *Revista Patologia Tropical*. v. 32, n.1, p.46-52, jan. 2003.
- THARANATHAN, R.N. & KITTUR, F.S. Chitin - The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.43, p.61–87, 2003.
- TORRES, E.A.F.S., RIMOLI, C.D., OLIVO, R., HATANO, M.K. & SHIMOKOMAKI, M. Papel do sal iodado na oxidação lipídica em hambúrgueres bovino e suíno (misto) ou de frango. Fev.1998. Disponível em<
http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos_de_comunicacao/CTA/VO_L18N1/CTA18N1_09.PDF> acessado em: 08/07/14.
- TSAI, G–J. & HWANG, S–P. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bactéria. *Fisheries Science*, 70, p.675-681. 2004.

- TSAIH, M.L. & CHEN, R.H. Molecular weight determination of 83% degree of desacetylation chitosan with non-gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. *Journal of Applied Polymer Science*. v.71, p.1905-1913, 1999.
- UNNEVEHR, L., ROBERTS, T. & CUSTER, C. New pathogen testing technologies and the market for food safety information. *Ag Bio Forum*.v.7, n.4, p.212-218, 2004.
- VELDHUIZEN, E.J.A. & CREUTZBERG, T. Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in steak tartare. *J. Food Prot.* V.70, n.9, p.2127–2132, 2007.
- WELKER, C.A.D., BOTH, J.M.C., LONGARAY, S.M., HAAS, S., SOEIRO, M.L.T. & RAMOS, R.C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos sem surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*. Porto Alegre, v.8, n.1, p.44-48, jan./mar. 2010.
- WINTEROWD, J.G. & SANDFORD, P.A. “Chitin and Chitosan”. En *Food Polysaccharides and Their Applications*, Stephen, A M (editor), Marcel Dekker. Nueva York, 1995.
- WYDRO, P., KRAJEWSKA, B. & HAC-WYDRO, K. Chitosan as a lipid binder: a langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions. *BIOMACROMOLECULES*. V.3, p.2611–2617, 2007.
- YADAV, A.V. & BHISE, S.B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. *Current Science*, v. 87, n. 9, p. 1176- 1178, nov. 2004.
- ZAKRZEWSKA, A., BOORSMA, A., BRUL, S., HELLINGWERF, K.J & KLIS, F.M. Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryotic Cell*. V.4, p.703-715, 2005.
- ZANSKY, S., WALLACE, B., SCHOONMAKER-BOPP, D., SMITH, P., RAMSEY, F., PAINTER J., GUPTA, A., KALLURI, P. & NOVIELLO, S. Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Newport. *Morbidity and mortality weekly report, United States*, v. 51, n. 28, p. 545-548, jan/abr. 2002.
- ZHENG, L–Y. & ZHU, J–F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, v.54, n. 4, p. 527- 530, dez. 2003.

APÊNDICES

Apêndice A: Ficha de Análise Sensorial



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Nome: _____ data: _____ Curso: _____

Período: _____ E-mail: _____ Celular/Whatsapp: _____

1. TESTE DE ACEITAÇÃO

INSTRUÇÕES: Você está recebendo 3 amostras, para serem avaliadas. Deguste cuidadosamente cada uma das amostras. Avalie cada um dos atributos sensoriais atribua uma nota (de acordo com as descrições da primeira coluna).

	ATRIBUTO	CÓDIGO:	CÓDIGO:	CÓDIGO:
1- Desgostei extremamente	Aparência			
2- Desgostei moderadamente				
3- Desgostei regularmente	Cor			
4- Desgostei ligeiramente				
5- Não gostei/nem desgostei	Odor			
6- Gostei ligeiramente				
7- Gostei regularmente	Sabor			
8- Gostei moderadamente				
9- Gostei extremamente	Textura			

2. TESTE DE ORDENAÇÃO (Preferência)

INSTRUÇÕES: Escreva o código das amostras por ordem de preferência.

1ª _____ 2ª _____ 3ª _____

3. TESTE DE ORDENAÇÃO (Intenção de Compra)

INSTRUÇÕES: Após a avaliação das amostras atribua uma nota (de acordo com as descrições da primeira coluna) quanto a intenção de compra de cada produto.

	CÓDIGO:	CÓDIGO:	CÓDIGO:
5- Certamente compraria			
4- Provavelmente compraria			
3- Tenho dúvida se compraria			
2- Provavelmente não compraria			
1- Certamente não compraria			

Comentários: _____

Apêndice B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “BIOATIVIDADE DE QUITOSANA NA INIBIÇÃO DE CEPAS PATOGÊNICAS EM HAMBÚRGUERES”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora MICHELLE GALINDO DE OLIVEIRA, com endereço Rua Gervásio Fioravante, 92, apt 502, Graças, Recife-PE. CEP 52011-030. Telefone (81) 991994639. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Roberta de Albuquerque Bento, Telefone: (81) 988316997 e está sob a orientação de Thayza Christina Montenegro Stamford, Telefone: (81) 985774611, e-mail thayzastamford@yahoo.com.br.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com a pesquisadora responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

➤ Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a bioatividade da quitosana em hambúrgueres. Os participantes deverão fazer uma comparação de sabor, textura, odor e características visuais do hambúrguer contendo a quitosana, comparar com os tratamentos testemunha (sem o antimicrobiano), por meio de avaliação sensorial. As amostras dos produtos serão servidas, aos provadores, em cabines individuais iluminadas com luz branca, à temperatura de 24 °C, em copos descartáveis, aleatoriamente codificados.

➤ **RISCOS diretos** para o voluntário pequeno risco, quanto ao desconforto sensorial. Após a análise, o participante receberá água para aliviar o desconforto, caso haja.

➤ **BENEFÍCIOS diretos e indiretos** para os voluntários: a quitosana é um produto natural que possui propriedades medicinais para a saúde humana, trazendo assim benefícios para os componentes do painel sensorial. Vale salientar que a ANVISA considera a quitosana como um alimento funcional, isto é, alimento que produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br**).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com a pesquisadora responsável, concordo em participar do estudo Bioatividade de Quitosana na Inibição de Cepas Patogênicas em Hambúrgueres, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data _____ Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

Apêndice C: ARTIGO 1

Título: INHIBITION OF *Staphylococcus aureus* IN BEEF BURGER BY CHITOSAN

Status do Artigo: Enviado

Periódico: Meat Science

Qualis Nutrição: B1

Fator de Impacto: 2,615

ABSTRACT

This study evaluated the inhibition of *Staphylococcus aureus* in beef burger by chitosan. The antimicrobial assays were performed using the macrodilution method for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The burgers were produced as follows: the ingredients were grinded and homogenized until obtaining a smooth batter. Chitosan was added subsequently in the proportion of 2.5mg/mL (C2) and 5.0mg/mL (C5), relating to the MIC and MBC. The control (C) assay was carried out without chitosan. The burgers were infect with *S. aureus* and stored at freezing temperature of -18°C. The bacterial count was performed with 0, 1, 5, 10, 15 and 30 days intervals. In the C2 and C5 samples significant reductions of microbial growth were observed since the first day from C, but without statistical difference between them. This study demonstrates that chitosan can be a viable alternative for the preservation of burgers and could be used by food industry.

Keywords: natural products, antimicrobial agents, biopolymer

HIGHLIGHTS

1. Chitosan in MIC and MBC showed similar reduction of *S. aureus* in burgers storage.
2. At -18°C chitosan, up to 2 log reduction of *S. aureus* on burgers during 30 days.
3. Chitosan demonstrated potential for use as a natural preservative in burger.

1. Introduction

The burger is a meat product, with intrinsic organoleptic characteristics, that can be obtained from minced meat of animals, with or without added fat and other ingredients. The nutritional value and the practicality of the burger combined with the lifestyle in urban centers makes it a popular food. However, pathogens have been described to develop in the surface of the product. (Desmarchelier et al., 2007).

Foodstuff contamination with *S. aureus* may occur due to inadequate hygiene during food handling or directly from infected food-producing animals (Abdallah et al, 2015). The presence of *S. aureus* in food is important since has been considered an important cause of foodborne intoxication and/or infection around the world. The meat and meat products are considered the main contamination carriers of *S. aureus* (Rahimi , 2013; Abdallah et al, 2015).

In order to reduce the levels of chemical additives in food, researches using natural compounds seek a better use of preservatives to provide the highest quality of food for consumers (Coma, 2008; Bento et al, 2009). In this context chitosan stands out as a natural polymer essentially composed of β -1,4-D-glucosamine (GlcNAc) linked to *N*-acetyl-D-glucosamine residues (Bento et al, 2009; Berger et al, 2014). Its importance relies on its atoxic feature, low cost, originated by renewable natural sources, biocompatibility and biodegradability. The antimicrobial activity of chitosan is considered one of its most promising properties, since it demonstrates a broad spectrum of antimicrobial activity. This versatility makes it a polysaccharide of great economic and environmental importance (Darmadji & Izumimoto, 1994; Kong et al, 2010; Berger et al, 2014).

Considering the many applications and advantages afore mentioned offered by chitosan, it can be considered a promising option as a natural preservative. Aligned with this prospect, this study aimed to determine the bioactivity of chitosan in inhibiting *S. aureus* in burgers.

2. Material and methods

2.1 Chitosan solution preparation

Chitosan of medium molecular weight and 83% of deacetylation degree from Sigma-Aldrich® was solubilized in a solution of 1% acetic acid to obtain a final concentration of 20 mg/mL (w/v). The pH of the solution was adjusted to pH 5.8 using HCl and NaOH.

2.2 Microorganism and culture conditions

Staphylococcus aureus ATCC 6538 (Laboratory of Microbiology, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil) was used as revealed strain. Stock culture was maintained on Brain Heart Infusion (BHI) agar slants at 4 °C. The inocula used in the assays were obtained from overnight cultures grown on BHI broth at 37 °C. After incubation, bacterial cells were separated from the growth medium by centrifugation (10000 rpm, 10min), washed three times and resuspended in sterile saline (NaCl 0.85% w/v). Cell suspension was adjusted according to the McFarland scale (0.5), providing bacterial inocula of approximately 5×10^9 CFU/mL.

2.3 Production of beef burger

The preparation of beef burgers followed the formulas presented in Table 1 were prepared three types of sample: (C) sample control without added chitosan, (C2) with 2.5mg/mL chitosan and (C5) with 5.0mg/mL chitosan. Then 10g of each sample was fractionated in a glass container with airtight closure. The containers with burgers were sterilized in an autoclave.

2.4 Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of chitosan

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of chitosan on the bacteria were carried out using the macrodilution technique (Berger et al 2014).

For this, a 0.1 mL aliquot of *S. aureus* inoculum was inoculated into screw-capped sterile tubes containing BHI broth with the desired chitosan concentration (10.0–0.0 mg/mL) followed by shaking using a vortex for 30 s. The system was incubated at 37 °C for 24 h and MIC was

defined as the lowest concentration required to completely prevent visible bacterial growth (turbidity). An aliquot (100 μ L) of each tubes with no visible bacterial growth was subcultured on sterile Baird Parker agar at 37 °C for 48 h to determine the lowest chitosan concentration able to cause a 99.9% kill rate of the initial inoculum. MBC was defined as the lowest concentration which no growth was noted on Baird Parker agar. Control flasks without chitosan were tested in the same way. The assays were conducted in triplicate and the results expressed as average values.

2.5 *Interference of chitosan on the survival of S. aureus in beef burgers*

Samples of sterile burgers, described in subsection 2.3, were inoculated with 100 μ L of an *S. aureus* containing suspension and then stored at -18 ° C. The analysis of each sample was performed in duplicate after 1, 2, 5, 10, 15 and 30 days of storage. Before undergoing analysis, the burgers were thawed at 4 ° C for 24 hours. In each time the samples were diluted in 90 mL sterile saline (0.85% w/v) and homogenized with a sterile glass rod. Serial dilutions were performed to 10⁻⁸ in sterile tubes containing 9 mL of sterile saline. Then 100 μ L aliquot of each dilution was inoculated in Petri dishes containing Baird Parker agar with egg yolk emulsion and solution 1% potassium tellurite. The plates were incubated at 37 ° C for 48 hours, being carried out the counting of typical colonies of *S. aureus*. The results were expressed as Log₁₀ CFC/mL.

2.6 *Reproducibility and statistics*

Statistical analysis was performed using descriptive statistical tests (mean and standard deviation) and inferential (One Way Analysis of Variance - ANOVA, followed by Duncan test), to determine statistically significant differences ($p < 0.05$) between different treatments applied. The statistical analysis used the software Statistics for Windows 7.0.

3. Results and discussion

In determining the antimicrobial activity of chitosan against *S. aureus* were obtained MIC of 2.5 mg / mL and CBM of 5 mg / mL. These values were used for the burger assays.

The MIC and MBC concentrations found in this study are corroborated by Stamford et al. (2013), which found the same values of MIC and CBM to chitosan of high molecular weight

against *S. aureus*. In contrast, Berger et al (2014) to test low molecular weight fungal chitosan in inhibiting *S. aureus* obtained MIC 300 µg/mL and MBC 500 µg/mL. These authors described that the antibacterial activity of chitosan depends on the physicochemical characteristics of the polymer such as molecular weight and degree of deacetylation.

According to Kanatt, Chander & Sharma (2008) the values considered as the MIC chitosan may vary between 0.1 and 10mg.mL⁻¹ depending on the amount and type of pathogens present in food and the physical and chemical characteristics of the chitosan. According to Kim & Choi (1998), Bento et al (2009) and Dutta, Tripathi & Dutta (2011) chitosan has several advantages over other types of antimicrobial agents, because it has superior antibacterial activity and a broad spectrum of activity.

The mechanism of action of chitosan on the microorganisms is not fully elucidated, but several proposals are suggested (No et al., 2007). The cationic nature of chitosan resulting from the NH₃⁺ groups positively charged, may be a key factor that contributes to its interaction with the surface of negatively charged microbial cells. This may result in injury to bacterial vital metabolic activities (Kanatt, Chander & Sharma, 2008; Kong et al, 2010; Chung & Chen (2008) reported that chitosan reacts with both the cell wall as well as with the microbial cell membrane, but this does not occur simultaneously. The mechanism is two-fold: first separation of the cell wall followed by destruction of the cell membrane from the microorganism. Other mechanisms of action of chitosan reported in the literature are the interaction of the polymer with the microbial DNA interfering with mRNA and protein synthesis; performance of chitosan as a water and metal binding agent and can inhibit different enzymes (Chung & Chen, 2008; Bostan & Mahan, 2011).

The results obtained from the analyzes in burgers in relation of the interference of chitosan on the survival of *S. aureus* during 30 days of storage at -18 ° C, are shown in Figure 1.

As observed in Figure 1 on the first day of analysis showed an increase in the amount of *S. aureus* in the control sample with subsequent reduction (after 3 days). This reduction of the microbial load presented, around the third day, may be due to freezing retarding microbial growth. However in the C2 and C5 samples significant reductions were observed in the first day. This demonstrates the effectiveness of chitosan in inhibiting the growth of *S. aureus*, since all samples received the same amount of inoculum. The control sample (chitosan free) showed

during the time of analysis (1st to 30th day) significantly higher microbial load than the other samples, with an averaging 2 log difference in all analyzed times.

Among the samples C2 and C5 the behavior was similar but on the 5th day of analysis the reduction of C5 was significantly higher than C2, leveled again after 15 days of storage. Similar results were reported by Kanatt, Chander & Sharma (2008) when researching the potential of chitosan as a preservative in meat and meat products. These authors found that the effect of chitosan is concentration dependent, since the concentration of 0.01% was not effective against any of the tested bacteria, but at higher concentrations of 0.05% and 0.1% increased the antimicrobial effect against *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*.

Similar results were found in other studies regarding the antimicrobial activity of chitosan in meat and meat products. Darmadji & Izumitomo (1994) found an inhibitory effect of chitosan (0.5 -1.0%) against spoilage bacteria during storage of meat at 4 ° C for 10 days. These authors reported that the chitosan may induce greater enhancement of meat preservative quality, due to its high water binding capacity. Bostan & Mahan (2011) while researching the microbiological quality and shelf life of sausages treated with chitosan (0.25%, 0.5% and 1%) stored for 60 days, reported that the number of aerobic mesophilic microorganisms in all groups gradually increased during the storage period at 4 ° C. However, the increases in the samples treated with chitosan were significantly smaller than untreated group.

4. Conclusions

Considering the results, it was evidenced that the concentration of chitosan considered ideal for use in beef burger was 2.5 mg / ml, since this was equally effective at 5mg / ml in growth inhibition of *S. aureus*. Thus, the present study allows us to conclude that chitosan has the potential to be used as a natural preservative in alternate burger.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Federal University of Pernambuco for financial support and availability of infrastructure for conducting experiments.

References

- Abdallahman, L.S., Wells, H., & Fakhr, M.K. (2015). *Staphylococcus aureus* is More Prevalent in Retail Beef Livers than in Pork and other Beef Cuts. *Pathogens*, 4, 182-198.
- Bento, R.A., Stamford, T.L.M., Campos-Takaki, G.M., Stamford, T.C.M., & Souza, E.L. (2009). Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 583-589.
- Berger, L.R.R., Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., Alcântara, S.R.C., Silva, A.C., Silva, A.M. Nascimento, A.E., & Campos-Takaki, G.M. (2014). Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. *International Journal of Molecular. Sciences*, 15, 9082-9102.
- Bostan, K. & Mahan, F. I. (2011). Microbiological quality and shelf-life of sausage treated with chitosan. *J. fac. Vet. Med. Istanbul Univ.*, v. 37, n. 2, p. 117-126.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78, 90-103.
- Chung, Y., & Chen, C. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99, 2806-2814.
- Darmadji, P., & Izuminoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38(2), 243-254.
- Desmarchelier, P., Fegan, N., Smale, N., & Small, A. (2007). Managing safety and quality through the red meat chain. *Meat Science, Essex*, 77(1), 28-35.
- Dutta, J., Tripathi, S., & Dutta, P.K. (2011). Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*, 18(1), 3-34.
- Kanatt, S., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: a new perspective for meat and meat products. *Food Chemical*, 107, 845-852.
- Kim, C., & Choi, K.S. (1998). Synthesis and properties of carboxylkyl chitosan derivatives. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 4(1), 19-25.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., & Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.

- No, H.K., Meyes, S.P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of Food Science*, 72(5), 87-100.
- Rahimi, E. (2013). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 393-399.
- Stamford, T.C.M., Stamford-arnaud, T.M., Cavalcante, H.M.M, Macedo, R.O. & Campos-takaki, G.M. Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent. Cap 9. P.229-244.

Table 1. Ingredients and their quantities used in the production of burgers with and without chitosan.

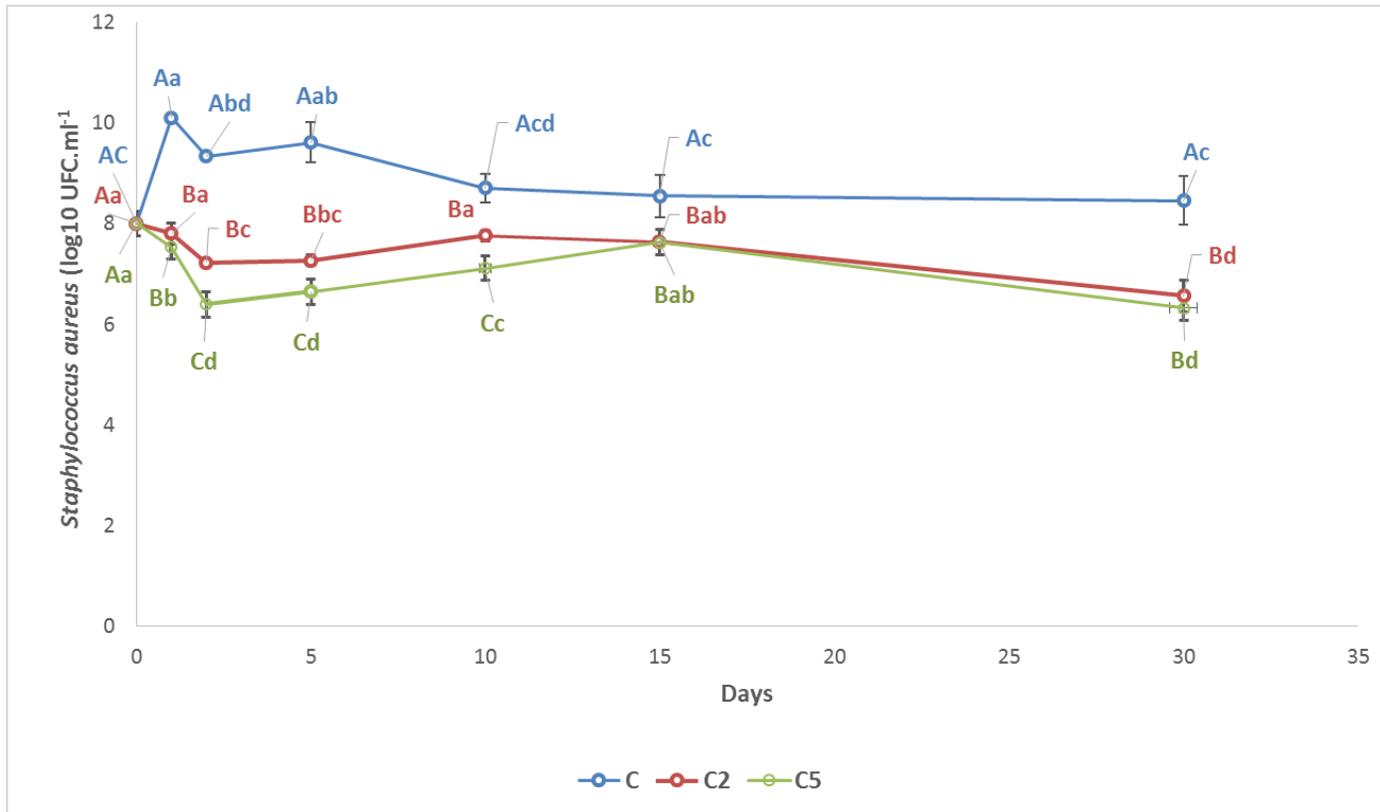
RAW MATERIAL	FC2*	FC5**	FC***
Beef	100g	100g	100g
Coriander	5g	5g	5g
Black pepper	0,01g	0,01g	0,01g
Sugar	3g	3g	3g
Onion	5g	5g	5g
Salt	1,5g	1,5g	1,5g
Wheat flour	10g	10g	10g
Vegetable oil	-	-	5 ml
Chitosan	12,5ml	25ml	-

*FC2 - Burger formulation with chitosan at a concentration of 2.5mg / ml

**FC5 - Burger formulation with chitosan at a concentration of 5.0mg / ml

***FC- Burger formulation control

Figure 1. Behavior of *Staphylococcus aureus* in burger with and without addition of chitosan stored at -18 ° C for 30 days.



Apêndice D: ARTIGO 2

Título: CHARACTERIZATION AND CHITOSAN BIOACTIVITY OF THE INHIBITION PATHOGENIC STRAINS IN BURGERS

Status do Artigo: Enviado

Periódico: International Journal of Food Microbiology

Qualis Nutrição: A1

Fator de Impacto: 3,082

CHARACTERIZATION AND BIOACTIVITY OF CHITOSAN AGAINST FOOD PATHOGENIC BACTERIA IN BURGER

Michelle Galindo de Oliveira^a, Roberta de Albuquerque Bento^b, Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud^a, Samara Alvachian Cardoso Andrade^c, Tânia Lucia Montenegro Stamford^a, Thayza Christina Montenegro Stamford^{d*}.

^a *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

^b *Nutrition Center, Academic Center of Victoria St. Anthony, Federal University of Pernambuco, Vitoria de Santo Antônio, Brazil*

^c *Department of Chemical Engineering, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

^d *Laboratory of Microbiology, Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil*

* Correspondence author:

Name: Thayza Christina Montenegro Stamford (T.C.M.Stamford)

Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical . Av. Prof^ª Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil. 50670-901.

E-mail: thayzastamford29@gmail.com / thayza.stamford@pq.cnpq.br

Telephone: 55 +8121268526

Fax: 55+8121268473

ABSTRACT

The applicability and advantages of chitosan as a natural preservative has been considered an alternative to the use of chemical additives in processed foods. This study evaluated the inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by chitosan on beef Burger stored frozen, -18°C. Chitosan from crustaceans used was characterized about the degree of deacetylation and molecular weight by infrared spectrum, nuclear magnetic resonance (NMR ¹H), elemental analysis and viscosity. Chitosan was solubilized in 1% acetic acid (20mg/mL), with pH adjusted for 5.8. The concentration of chitosan varied 12.0 to 0.05 mg/mL. The antimicrobial activity of chitosan was evaluated against *S. aureus* and *L. monocytogenes* by microdilution method in brain heart infusion (BHI) broth, and subsequent incubation in BHI agar without substance test, for determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Bacteria were incubated at 37°C/24h. To MIC was used resazurin staining, as a bacterial growth. The burgers were produced in the laboratory; the ingredients were grinded and homogenized until obtaining a smooth batter, in which was added chitosan in the proportion of MIC and MBC. As controls were used burgers without the addition of chitosan as a negative control (C) and commercial burgers (H) with chemical additives as positive control. The burgers were infected with *L. monocytogenes* or *S. aureus* (5x10⁸ Colony Forming Unity / mL) and stored at -18 ° C for 30 days. The bacterial count was carried out at intervals of 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 and 30 days. The value of the average molar mass of chitosan was 7.4 x 10⁴ g/mol, corresponding to a chitosan with medium molecular weight. The deacetylation degree of chitosan obtained was between 64% (NMR ¹H) to 75% (elemental analysis). Chitosan solution demonstrated MIC and MBC, respectively of 2.5mg/mL and 5.0mg/mL to both bacteria. In all samples burgers were reduced microbial load, but the burgers added with chitosan showed a greater decrease than controls (C and H). The results of the study showed that chitosan inhibited *S. aureus* and *L. monocytogenes* in burgers stored at -18 ° C for 30 days, with MIC and MBC. Chitosan shows greater efficacy in reducing bacteria in burgers than chemical additives usually employed. This emphasizes that chitosan may be a viable alternative to the preservation of burgers, having application as a natural additive by the food industry.

Keywords: natural preservatives; antimicrobial agents; meat products, biopolymer ; foodborne diseases

HIGHLIGHTS

1. Chitosan in MIC and MBC showed similar reduction of *S. aureus* and *L. monocytogenes* in burgers storage.
2. At -18°C chitosan, up to 8log reduction of pathogenic bacteria on burgers to 30 days.
3. Chitosan demonstrated potential for use as a natural preservative in burger.
4. Chitosan had a higher inhibition rate of bacteria than chemical additives in burger.

1. Introduction

Burgers, one of the major RTE foods, widely consumed worldwide, that conquered popularity due to its sensorial characteristics, low cost and practicality (Min, Dawson & Hussain, 2013). However, a drawback is that this product can be contaminated easily during preparation, storage, and distribution (Bento et al 2009). Moreover, nutritional properties of meat are a contributing factor to the development of pathogenic microorganisms. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* are two of the major causes of foodborne diseases or food poisoning of public health concern associated with meat and meat products (Chung & Chen, 2008; Beverly et al., 2008; Lucera et al., 2012). Most outbreaks reported are mainly due to the presence of *S. aureus*, *Listeria* and others pathogenic bacteria involving meat products (Sánchez-Ortega et al., 2014).

To control the spoilage and contamination of food that promoting great economic losses and risks to the health, the attention of the food industry and consumers are focused on preservation of food against pathogenic microorganisms (Campos et al., 2011; Dutta, Tripathi & Dutta, 2011; Sánchez-Ortega et al., 2014; Miteluț et al., 2015). In addition, there is a demand for healthier food, consequently is required a decrease the use of chemical additives for extending the food shelf-life (Kanatt; Chander & Sharma, 2008; Bento et al., 2009; Miteluț et al., 2015). Accordingly, research into natural compounds is looking for an alternative employment and more

suitable preservative. In this sense, bioactive polymers, as chitosan, have shown efficacy as antimicrobial agents (Melo; Biscontini & Andrade, 2004; Dutta, Tripathi & Dutta, 2011; Sánchez-Ortega et al., 2014).

Chitosan is a natural co-polymer composed by units of 2-amino-2-desoxy-D-glycopyranose and of 2-acetamide-2-desoxy-D-glycopyranose with predominance of the first type (Stamford et al., 2007; Chung & Chen, 2008; Berger et al., 2014a; Younes & Rinaudo, 2015). This polysaccharide due to its antimicrobial, antioxidant, adsorptive, biodegradable and non-toxic properties has been highlighting and becoming popular as an alternative method of preservation in food, especially in meat products. (Kanatt, Chander & Sharma, 2008; Berger et al., 2014b; Younes & Rinaudo, 2015).

Considering the broad range of applicability and the advantages it offers chitosan can be considered as a promising option as a natural preservative. In this context, the present study aimed to evaluate the inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* by chitosan on beef Burger stored frozen, -18°C.

2. Material and methods

2.1 Chitosan solution preparation

Chitosan from Sigma-Aldrich® was solubilized in a solution of 1% acetic acid to obtain a gel with final concentration of 20 mg/mL (*w/v*). The pH of the gel was adjusted to pH 5.8 using HCl and NaOH.

2.2 Bacterial strains and culture conditions

A stock culture of *Listeria monocytogenes* (ATCC 7664) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (Laboratory of Microbiology, Department of Nutricion, UFPE, Recife, Brazil) was maintained in brain–heart infusion (BHI) broth (Difco Laboratories, Detroit, MI) at -70°C. The inoculums used in the experimental assays were obtained from overnight cultures grown in BHI broth at 37°C for 18h. Bacteria were washed three times in a 0.85% saline solution. Cell

suspension in 0.85% saline solution were adjusted with an optical density at 660 nm of 1.5, providing bacterial inocula of 1.5×10^9 CFU/mL.

2.3 Characterization of chitosan

Chitosan was characterized as its structural characterization, degree of deacetylation and molecular weight. All analyzes were performed in the Analytical Center of the Fundamental Chemistry Department of UFPE

The structural characterization of chitosan was performed by infrared (IR) spectroscopy using a spectrophotometer (Bomem Michelson FT-IR, model MB-102). 1.5mg of chitosan that was previously dried for 15h at 60 °C under reduced pressure. Then, chitosan was thoroughly blended with 100 mg of KBr to produce 0.5 mm-thick disks. The disks were dried for 24hrs at 110°C under reduced pressure. The spectrum was obtained in the region from 400 to 4000/cm (Stamford et al., 2007).

The molecular weights chitosan was determined by viscosimetry, using an AVS-350 viscometer (Schott-Geräte), type/capillary: Cannon-Fenske dinside = 1.01 mm, at 25 °C \pm 0,01. To determine the intrinsic viscosity $[\eta]$, there was prepared chitosan solution (using hydrochloric acid buffer as solvent) at concentrations ranging from 0.1 to 1.0 mg / ml. The flow time in seconds was determined. Five measures were made of each sample and calculated the mean. After obtaining the intrinsic viscosity from tables, K and a, were obtained: $K = 1.81 \times 10^{-5}$, $a = 0.93$. The viscosity was described as a function of its intrinsic viscosity, and the concentration was described using the Mark-Houving equation (eq 1). Viscosimetric molecular weight was expressed in g/mol (Santos et al., 2003).

$$[\eta] = K \left(\bar{M}_v \right)^a \quad (\text{Eq.1})$$

Where: $[\eta]$ is the intrinsic viscosity (mL/g), K and a are constants dependent on the solvent (in this case hydrochloric acid).

The degree of deacetylation of the chitosan was obtained by two techniques: elemental analysis and hydrogen nuclear magnetic resonance (^1H NMR).

The ^1H NMR spectra were obtained on a 300 MHz Varian Mercury Plus Spectrometer . The chitosan solution was prepared by dissolving 10mg of chitosan in D_2O containing 1% HCl (37%) for 24 hours to form a viscous solution. An aliquot of this solution was placed in a 5mm

diameter tube for analysis at 50 ° C, with a relaxation time of 6 seconds and 90 ° pulse. The degree of deacetylation was calculated by equation 2, proposed by Hirai et al. (1991), which uses the signals of protons H², H³, H⁴, H⁵, H⁶, H⁶ (H²⁻⁶) of both monomers and the peak relating to the acetamido group hydrogen nuclei (H^{Ac}).

$$DD(\%) = \left(1 - \left(\frac{1}{3} H^{ac} / \frac{1}{6} H^{2-6} \right) \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

The elemental analysis (carbon, hydrogen and nitrogen) of chitosan was obtained from Carlo ERBA Model EA 1108 analyzer. The degree of deacetylation was calculated by equation 3, proposed by Kassai et al. (2000), which is based on the ratio between carbon and nitrogen (C/N).

$$DD(\%) = \left[1 - \frac{(C/N) - 5.145}{6.816 - 5.145} \right] \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

2.4 Antimicrobial Activity

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of chitosan gel against *S. aureus* and *L. monocytogenes* were carried out using the broth microdilution method using microplaques with 96 wells. Chitosan gel concentrations were tested ranging from 0 to 12mg / ml. The microplates were prepared so that each well had a final volume of 100µl, with varying ratios of medium and test substance. For sterility control were added 100µl of medium alone; for growth control 80µL of medium. The all wells were added 20µL of the microbial inoculum, except for sterility control. The assay was performed in quadruplicate. After preparing the wells containing a culture medium, microbial test substance and inoculum, the system was incubated at 37 °C for 24 h and MIC was defined as the lowest concentration required to completely preventing visible bacterial growth. Resazurin was used as cell viability revealer (Palomino et al., 2002). To determine the CBM aliquots were removed, the wells before and after referring to the CIM and incubated in Petri dishes containing BHI agar medium without chitosan at 37 ° C for 48 hours. MBC was defined as the lowest concentration which no growth was noted on BHI agar.

2.5 Production of beef burger

The preparation of beef burgers followed the formulas presented in Table 1 were prepared three types of sample: (C) sample control without added chitosan, (C_{2.5}) with 2.5mg/mL chitosan and (C_{5.0}) with 5.0mg/mL chitosan. Then 10g of each sample was fractionated in a glass container with airtight closure. The positive control was acquired commercial burgers at the local supermarket, a very popular brand being chosen. The manufacture of burgers follows all the standards of hygiene and sanitation. After manufacture the burgers were stored at -18 ° C.

2.6 Interference of chitosan on the survival of *S. aureus* and *L. monocytogenes* in beef burgers

Burgers prepared as described in section 2.5 were used as substrates for the verification of chitosan bioactivity against pathogenic bacteria. Burgers without the addition of antimicrobial were used as negative control, and commercial burgers were used as positive controls for possessing chemical additives. The samples were separated in sterile glass containers, added with the inoculum of *L. monocytogenes* or *S. aureus* (final inoculum of 5×10^8 CFU / ml) and were then stored at -18 ° C during 30 days. The analysis (bacteria count) of each sample was performed in duplicate after 1, 2, 5, 10, 15 and 30 days of storage. In each time the samples were diluted (1:10 w/v) in sterile saline (0.85% w/v) and homogenized with a sterile glass rod during 5 minutes. Serial dilutions were performed to 10^{-8} in sterile saline. Then 100 μ L aliquot of each dilution was inoculated in Petri dishes containing Baird Parker agar with egg yolk emulsion and solution 1% potassium tellurite for *S. aureus* and Listeria Selective Agar (Oxford formulation) for *L. monocytogenes*, incubated at 37 ° C for 48 hours. The results were expressed as Log.

2.7. Reproducibility and statistics

Statistical analysis was performed using descriptive statistical tests (mean and standard deviation) and inferential (One Way Analysis of Variance - ANOVA, followed by Duncan test), to determine statistically significant differences ($p < 0.05$) between different treatments applied. The statistical analysis used the software Statistics for Windows 7.0.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of chitosan

Table 2 shows the characteristic bands of the functional groups of chitosan and its attempts assignments. The structural characterization obtained by infrared spectroscopy is similar to those reported in the literature (Nunthanid et al., 2001; Stamford et al., 2007; Fai et al., 2011; Berger et al., 2014a; Berger et al., 2014b). The spectrum obtained for the chitosan Sigma® shows a broad peak in 3462cm^{-1} , corresponding to the axial deformation of OH, which appears overlapping the band of the axial NH (amine group) deformation. This indicating the intermolecular hydrogen linking formation, and at the displacement of the higher frequency band indicating an increase in the structural order (Stamford et al., 2007).

The free primary amine group (-NH₂) at the C2 position of the glucosamine also provides another peak in the region between 1220 and 1020 cm^{-1} which was observed in the spectrum at 1076 cm^{-1} . The peak at 2878.4 cm^{-1} represents C-H aliphatic stretching and the peak at 1652 cm^{-1} corresponds to the axial deformation of the band C = O of amide group I to chitin. This suggests that the sample is not completely deacetylated. While the vibrational mode of the angular deflection of the connection NH (amide II) appears as a shoulder at 1595.7 cm^{-1} . The peak in 1378 cm^{-1} represents the C-O stretch of the primary alcohol group (-CH₂ - OH). The axial deformation appears in the amide C-N 1428.1 cm^{-1} . And, the intense band between 1076 and 663 cm^{-1} is related to piranosídics rings, as was reported by Shigemasa et al. (1996).

The determination of degree of deacetylation by ¹H NMR is performed using a relation between peaks relating to protons of acetamido group of chitin and other protons, except the proton of the anomeric carbon (C1) of chitosan / chitin (Lavertu et al., 2003). In this technique the measurement should be performed at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ to prevent intermolecular interactions and intramolecular of chitosan. Since these interactions modify the relaxation time responsible for the integration of peaks influencing thereby the value of the degree of deacetylation obtained. Thus, it is also necessary that the measurements are carried out quickly so as to minimize problems caused by the hydrolysis of chitosan, or the breaking of glycoside bonds which form the biopolymer. Table 3 shows the integration of ¹H NMR spectra peaks of chitosan Sigma® for calculating the degree of deacetylation by the formula proposed by Hirai et al. (1991). The

deacetylation degree value calculated by the equation Hirai et al. (1991) was 64%.

Segundo Kassai et al. (2000) the C / N ranges from 5,145 to completely deacetylated chitosan (chitosan monomer) to fully acetylated chitin to 6,816 (the chitin monomer). The percentage of carbon, nitrogen, hydrogen and carbon / nitrogen ratio found in the chitosan sample were 41.3782, 7.4331, 7.3555 and 5.67, respectively. From these data, the degree of deacetylation calculated by elemental analysis was 75%. This method is only accurate for chitosan which has no residues of proteins.

We have found that the results of the deacetylation degree of the chitosan was different among the techniques used (62% DD ^1H NMR and 75%DD elemental analysis). What could possibly justify this difference between the degree of deacetylation obtained, is the fact that chitosan is not purified, so the biopolymer should present residual proteins.

It is worth emphasizing that the NMR is a technique widely used to analyze polymers and determine the sample purity which makes it a reliable method for this experiment. Thus, although different values have been obtained for the degree of deacetylation, depending on the technique used, we considered the degree of deacetylation of chitosan equal to 64%.

The average viscosimetric molecular weight (*MV*) of chitosan obtained in this study is $7,4 \times 10^4$ g/mol, which is considered relatively low. The result is in agreement with the literature, which reports molar weights ranging between 1.0×10^4 g/mol to 9.0×10^5 g/mol (Stamford et al., 2007; Fai et al., 2011; Berger et al., 2014a; Berger et al., 2014b). The method for chitosan extraction from crustacean which usually involves high temperatures and concentrated NaOH solution may have influenced the breaking of the polymer resulting in chitosan of a low molecular weight and low viscosity. The viscosity of the chitosan is directly related with the molecular weight of this biopolymer (Berger et al., 2014a) These characteristics provide improved solubility in water at physiologically acceptable pH values which facilitates some applications in the food, medical, agricultural industries as an antimicrobial and preservative agent according to the literature (No et al., 2007; Dutta, Tripathi & Dutta, 2011; Berger et al., 2014a; Berger et al., 2014b). According to Bento et al. (2009) the molecular weight of chitosan influence the tensile strength, and consequently the tensile strength which allows chitosan with low molecular weight increase its permeability to the bacterial membrane

3.2 Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of chitosan for the bacteria tests (*S. aureus* and *L. monocytogenes*) was evaluated according to the determination of MIC and MBC. It was observed that chitosan inhibited the growth of bacteria tested, with similar static and biocida effect, with MIC of 2.5mg/mL and MBC of 5.0mg/mL. Bento et al. (2009) reported same value of MIC and MBC of the polymer for *L. monocytogenes*. Tsai & Huang (2004) observed the antimicrobial activity of chitosan against some pathogenic bacteria and reported that the MIC for *S. aureus* ranged from 50 to 200 ppm, smaller than that obtained in this study.

Stamford et al. (2013) have evaluated the antimicrobial activity of chitosan from fungi with different molecular weights against *S. aureus*, referring greater effectiveness in inhibiting bacteria by low molecular weight chitosan (MIC 1.25 mg/mL and CBM of 2.5mg/mL) than high molecular weight chitosan (MIC 2.5 mg/mL and MBC 5.0 mg/mL). Berger et al. (2014b) found MIC and MBC lower than reported in this study for *S. aureus* (MIC 0.3 mg/mL and MBC 0.5mg/mL) and *L. monocytogenes* (MIC 0.5 mg/mL and MBC 1.0mg/mL), when tested fungal chitosan of low molecular weight. The differences between the inhibitory concentrations of chitosan reported in this study and in the literature confirm that the antimicrobial activity of chitosan depends on the origin, obtaining methodology and physicochemical characteristics of the polymer.

According to Kim & Choi (1998), Bento et al (2009) and Dutta, Tripathi & Dutta (2011) chitosan has several advantages over other types of biocides, because it has superior antibacterial activity and a broad spectrum of activity, also showing effectiveness against some fungi and viruses. According to Kanatt, Chander & Sharma (2008) the antimicrobials chitosan values may vary between 0.1mg/mL to 10mg/mL depending on the number and type of pathogens and the physical and chemical characteristics of the polymer.

The key of chitosan antimicrobial action has not yet been elucidated, and many mechanisms are suggested. Several mechanisms are described in the literature. The positive load of the chitosan interacts with the negative load of the microbial cell wall, promoting the rupture and loss of intracellular constituent. Another postulate is the polymer interacts with the cellular membrane of the microorganism modifying the electric potential due to promote displacement of Ca^{++} of the anionic sites, damaging them. Another possibility is that the protonated amino groups

of the chitosan bind to anionic groups of the microorganisms, resulting in the agglutination of the microbial cells, and growth inhibition. Chitosan with low molecular weight penetrates in the cell and is linked to the microorganism DNA inhibiting the transcription, whereas the chitosan of high molecular weight acts as a chelate agent, binding to the cell membrane preventing the exchange of materials between the intracellular and extracellular environments (Wydro, Krajewska & Haczydro, 2007; Raafat et al., 2008; Chung & Chen, 2008; Bento et al., 2009; Kong et al., 2010; Dutta, Tripathi & Dutta, 2011; Lucera et al., 2012; Stamford et al., 2013; Sánchez-Ortega et al., 2014; Berger et al., 2014b; Younes & Rinaudo, 2015).

3.3 Interference of chitosan on the survival of *S. aureus* and *L. monocytogenes* in beef burgers

The MIC and MBC values were used for the burger assays and compared with chemical additives commercially used in burger. The results obtained from the analyzes in burgers in relation of the interference of chitosan on the survival of *S. aureus* and *L. monocytogenes* during 30 days of storage at -18 ° C, are shown in Figures 1 and 2.

The survival of *L. monocytogenes* in burgers over the 30 days of storage at -18 ° C is shown in Figure 1. On day 1 reduction was observed for all samples 3Log for control (C) and commercial burger (H) and 7Log for burgers treated with chitosan (C_{2.5} e C_{5.0}). There was no significant change in the *Listeria* counts for all samples during the remaining storage time (30 days). It is suggested by the literature that chitosan biocida effect on *L. monocytogenes* is due to the electrostatic interaction between the chitosan NH₃⁺ groups and negatively charged phosphoryl groups in bacterial cell (Liu, Zhang & Xia, 2004; Bento et al., 2009; Berger et al., 2014b).

The reduction of the *L. monocytogenes* load presented in the four samples during the first days can be explained due to freezing be a method of retarding microbial growth. On the initial stage of freezing occur greater reductions in the population of bacteria, which is related to the conditions of adaptation of psychrotrophic microorganisms. *L. monocytogenes* has the ability to adapt to lower temperatures since it produces phospholipids with shorter fatty acids and more branched chain (Veldhuizen & Creutzberg, 2007). Gounadaki et al. (2007) studying the survival of *L. monocytogenes* in sliced salami stored on different temperatures observed greater inhibition at room temperature (25 ° C) than to lows temperatures (15 ° C and 5 ° C).

As observed in Figure 2 on the first day of analysis showed a decrease in the amount of *S. aureus* of 3Log in all samples. However on the 13th day of storage of the samples containing chitosan gel (Q_{2.5} and Q_{5.0}) showed a greater reduction than the controls samples (C and H). Chung & Chen (2008) evaluated the antibacterial activity of low-molecular weight chitosan by the mortality rates of *Escherichia coli* and *S. aureus* and they verified that chitosan can destroy the cell structure of bacterial cells, resulting in the leakage of enzymes and nucleotides from different cell locations.

Similar results were found in other studies regarding the antimicrobial activity of chitosan in meat and meat products. Darmadji & Izumitomo (1994) describe a decrease of spoilage bacteria in meat treated with chitosan and stored at 4°C for 10 days, and they suggest that the chitosan due to its high water binding capacity, induce a greater appreciation of the preservative quality meat. Bostan & Mahan (2011) studying the microbiological quality and shelf life of sausages treated with chitosan (0.25%, 0.5% and 1%) stored for 60 days at 4°C, reported that the number of microorganisms in all groups increased, gradually, during the storage period, but in the samples treated with chitosan the bacterial growth was significantly smaller than untreated group.

The results of this study demonstrate that the concentration of chitosan considered ideal for use in beef burger was 2.5 mg / ml (MIC) since this was equally effective at 5.0 mg /mL (MBC) in inhibiting the growth of *L. monocytogenes* and *S. aureus*. In this study it was found that chitosan was more effective in inhibiting *S. aureus* and *L. monocytogenes* in burger, stored at -18 ° C for 30 days, than the chemical additives (commercial burger). Thus chitosan can be considered as a viable alternative to preserve burger, having broad perspective for use by the food industry.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Federal University of Pernambuco for financial support and availability of infrastructure for conducting experiments.

References

- Bento, R.A., Stamford, T.L.M., Campos-Takaki, G.M., Stamford, T.C.M. & Souza, E.L. (2009). Potential of chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as alternative natural compound to inhibit *Listeria monocytogenes*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 583-589.
- Berger, L.R.R., Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, M., Franco, L.Do.O., Nascimento, A.E.Do, Cavalcante, H.M.DeM., Macedo, R.O. & Campos-Takaki, G.M. (2014a). Effect of Corn Steep Liquor (CSL) and Cassava Wastewater (CW) on Chitin and Chitosan Production by *Cunninghamella elegans* and Their Physicochemical Characteristics and Cytotoxicity. *Molecules*, v.19, p. 2771-2792; doi:10.3390/molecules19032771.
- Berger, L.R.R, Stamford, T.C.M, Stamford-Arnaud, T.M., Alcântara, S.R.C., Silva, A.C., Silva, A.M. Nascimento, A.E. & Campos-Takaki, G.M. (2014b). Green Conversion of Agroindustrial Wastes into Chitin and Chitosan by *Rhizopus arrhizus* and *Cunninghamella elegans* Strains. *International Journal of Molecular. Sciences*, 15, 9082-9102.
- Beverlya, R.L., Janes, M.E., Prinyawiwatkula, W. & No, H.K. (2008). Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* v. 25, p.534-537.
- Bostan, K. & Mahan, F. I. (2011). Microbiological quality and shelf-life of sausage treated with chitosan. *J. fac. Vet. Med. Istanbul Univ.*, v. 37, n. 2, p. 117-126.
- Campos, C.A., Castro, M.P., Gliemmo, M.F. & Schelegueda, L.I. (2011). Use of natural antimicrobials for the control of *Listeria monocytogenes* in foods. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A. Méndez-Vilas (Ed.), p. 1112-1123.
- Chung, Y.-C. & Chen, C. Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 8, p. 2806-2814.
- Darmadji, P. & Izuminoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38(2), 243-254.
- Dutta, J., Tripathi, S. & Dutta, P.K. (2011). Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*, v. 18, n. 1, p. 3-34.
- Fai, A.E.C., Stamford, T.C.M., Stamford-Arnaud, T.M., Santa-Cruz, P.D., Da Silva, M.C.F., Campos-Takaki, G.M. & Stamford, T.L.M. (2011). Physico-Chemical Characteristics and

- Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. *Molecules*, v.2, n. 16, p. 7143-7154; doi:10.3390/molecules16087143.
- Gounadaki, A.S., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H. & Nychas G.J. E. (2007). Effect of packaging on the survival of *Listeria monocytogenes* on sliced salami. *Journal of Food Protection* v. 70, p.2313–2320.
- Hirai, A., Odani, H. & Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy *Polymer Bulletin*. 26: p.87-94.
- Kanatt, S.; Chander, R.; Sharma, A. (2008). Chitosan and mint mixture: a new perspective for meat and meat products. *Food Chemical*, v. 107, p. 845-852.
- Kasaai, M.R., Arul, J. & Charlet, G. (2000). Intrinsic Viscosity-Molecular Weight Relationship for Chitosan. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 38, 2591-2598.
- Kim, C. & Choi, K.S. (1998). Synthesis and properties of carboxylkyl chitosan derivatives. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 4, n. 1, p. 19-25.
- Kong, M., Chen, X.G., Xing, K., & Park, H.J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 51-63.
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A.N. et al. (2003). A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of desacetylations of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 32, 1149-1158.
- Liu, J.; Zhang, J. & Xia, W. (2004). Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, v. 107, p.419-425.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A. & Del Nobile, M.A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. V.3, Article 287, p.1-13.
- Melo Filho, A.B., Biscontini, T.M.B., Andrade, S.A.C. (2004). Level nitrite and nitrate in sausages commercialized in metropolitan region of Recife. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 24, n. 3, p. 390-392.
- Miteluț, A.C., Tănase, E.E., Popa, V.I. & Popa, M.E. (2015). Sustainable alternative for food packaging: chitosan biopolymer - A review. *AgroLife Scientific Journal*. v. 4, n.2, p.52-61.
- Min, M., Dawson, C.O. & Hussain, M.A. (2013). Microbiological Risk Assessment of Hamburgers Sold in Canterbury New Zealand. *Internet Journal of Food Safety*, 13, 99-102.

- Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S., Yamamoto, K. & Peck, E.G. (2001). Physical Properties and Molecular Behavior of Chitosan films. *Drug development and Industrial Pharmacy*. 27:143-157.
- No, H.K., Meyes, S.P., Prinyawiwatkul, W. & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *Journal of Food Science*, 72(5), 87-100
- Palomino, J.-C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J. & Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 46, p.2720-2722.
- Raafat, D., Barga, K. Hass, A. & Sahl, H. (2008). Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 12, p. 3764-3773.
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B.E., Santos-López, E., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J.E. & Regalado, C. (2014). Antimicrobial Edible Films and Coatings for Meat and Meat Products Preservation. Article ID 248935. p. 1-18.
- Santos, J.E., Soares, J.P., Dockal, E.R., Campana Filho, S.P. & Cavalheiro, E.T.G. (2003). Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. *Polímeros, Ciência e Tecnologia*. v. 13, p. 242–249.
- Shigemasa, Y., Matura, H., Sashiva, H. & Saimoto, H. (1996). An improved IR spectroscopic determination of degree of deacetylation of chitin, in *Advances in Chitin Science, Vol I*, ed by Domard A, Jeuniau C, Muzzarelli RAA and Roberts G, Jacques Andre´ Publishers, Lyon, France. p. 204–209.
- Stamford, T.C.M., Stamford, T.L.M., Stamford, N.P., Neto, B.B. & Campos-Takaki, G.M. (2007). Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. v.10, n. 1, p.8.
- Stamford, T.C.M, Montenegro, T., Cavalcante, H.M.DEM., Oliveira, R. & Campos-Takaki, G.M. (2013). Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent. In: Andrade, A.O., Pereira, A. A., Naves, E. L. M. & Soares, A. B.(Org.). *Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent*. 1ed. Rijeka: InTech, p. 229-244

- Tsai, G–J. & Hwang, S–P. (2004). In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. *Fisheries Science*, 70, p.675-681.
- Veldhuizen, E.J.A. & Creutzberg, T. (2007). Low temperature and binding to food components inhibit the antibacterial activity of carvacrol against *Listeria monocytogenes* in steak tartare. *Journal of Food Protection*. v.70, n.9, p.2127–2132.
- Wydro, P., Krajewska, B. & Hac-Wydro, K. (2007). Chitosan as a lipid binder: a langmuir monolayer study of chitosan-lipid interactions. *Biomacromolecules*. v.3, p.2611–2617.
- Younes, I. & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, v.13, p.1133-1174; doi:10.3390/md13031133

Table 1. Ingredients and their quantities used in the production of burgers with and without chitosan.

RAW MATERIAL	C _{2,5} *	C _{5,0} **	C***
Beef	100g	100g	100g
Coriander	5g	5g	5g
Black pepper	0,01g	0,01g	0,01g
Sugar	3g	3g	3g
Onion	5g	5g	5g
Salt	1,5g	1,5g	1,5g
Wheat flour	10g	10g	10g
Vegetable oil	-	-	5 ml
Chitosan	12,5ml	25ml	-

*C_{2,5} - Burger formulation with chitosan at a concentration of 2.5mg / ml

**C_{5,0} - Burger formulation with chitosan at a concentration of 5.0mg / ml

***C- Burger formulation control without chitosan or chemical additives

Table 2. Allocation of infrared bands of chitosan Sigma®.

Wave-length (cm ⁻¹)	Attempts allocations
663 a 1076	Piranosidics rings
1378	(-CH ₂ – OH) ν _{C-O}
1428,1	(amide) ν _{C-N}
1595,7	(amide II) δ _{NH}
1652	(amide I) ν _{C=O}
2878,4	ν _{C-H}
3462	ν _{O-H} (amine) δ _{NH}

Table 3. Integration of the ¹H NMR spectrum the peaks of chitosan Sigma® for calculating the degree of deacetylation.

Hydrogens	Integration of the peaks
	Chitosan Sigma®
H ^{ac}	15,38
H ²	13,41
Σ H ^{2,3,4,5,6,6'}	84,03

Figure 1: chitosan interference on the survival of *Listeria monocytogenes* in hamburgers during the period of 30 days, -18°C.

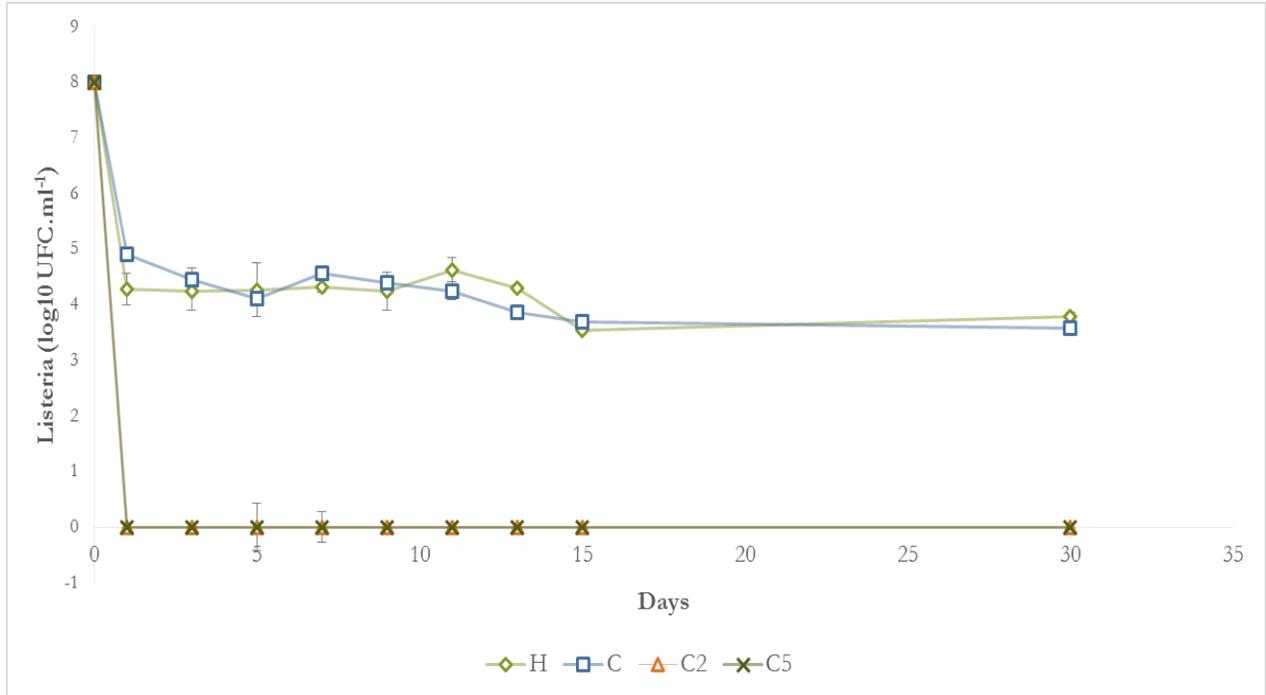
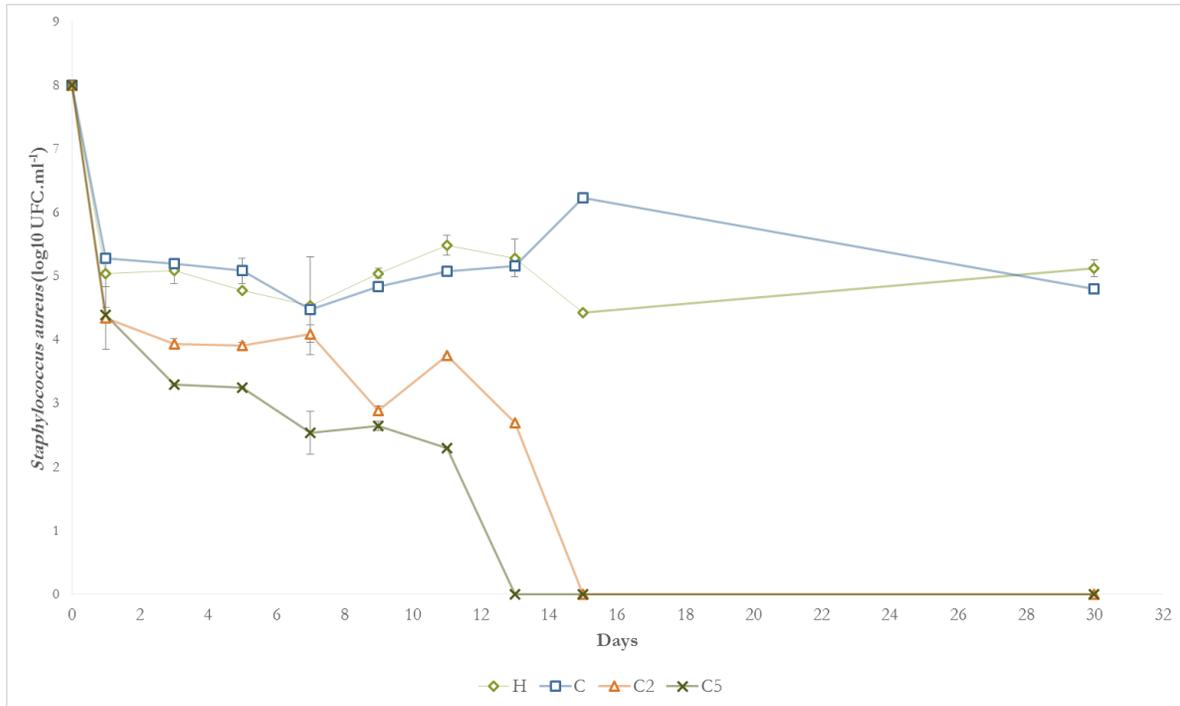


Figure 2: Interference chitosan on the survival of *Staphylococcus aureus* in hamburgers during the 30 days storage period at -18 ° C.



Apêndice E: ARTIGO 3

Título: BURGER STABILITY ASSESSMENT OF CHITOSAN ADDED DURING STORAGE

Status do Artigo: A ser Enviado

Periódico: Food Research International

Qualis Nutrição: A2

Fator de Impacto: 2,818

AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE HAMBÚRGUER ADICIONADO DE QUITOSANA DURANTE O ARMAZENAMENTO

Michelle Galindo de Oliveira, Roberta de Albuquerque Bento, Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud, Samara Alvachian Cardoso Andrade, Thayza Christina Montenegro Stamford*.

Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

* Correspondence author at:

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Medicina Tropical, 50670-901, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil. Tel.: + 55 81 2126 3525; E-mail: thayzastamford29@gmail.com (T.C.M. Stamford).

RESUMO

Os produtos cárneos apresentam alto consumo mundial e devido as suas propriedades nutricionais contribuem para o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos. A indústria de alimentos vem tentando reduzir os níveis de aditivos químicos e investindo em pesquisa de compostos naturais que tenham ação conservante. A quitosana é um polímero natural que apresenta aplicações em alimentos, pois dentre suas várias propriedades destaca-se sua ação antimicrobiana. Este estudo teve como objetivo verificar a estabilidade de hambúrguer adicionado de quitosana durante o armazenamento. No produto cárneo preparado, com e sem quitosana, foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas, sensorial mensalmente durante o período de 4 meses para verificação da vida de prateleira. O teste sensorial dos hambúrgueres elaborados, com e sem quitosana, foi avaliado através de uma escala hedônica. Durante o armazenamento não ocorreram alterações prejudiciais às características organolépticas e microbiológicas devido à interação da quitosana com os demais constituintes dos hambúrgueres. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que hambúrgueres adicionados de quitosana apresentaram estabilidade durante 120 dias à -18°C. Dessa forma a quitosana pode ser considerada uma alternativa viável na preservação de alimentos, podendo ser utilizada como conservante natural em hambúrguer.

Palavras chaves: conservação de alimentos, produtos cárneos, vida de prateleira.

1. Introdução

O hambúrguer, produto cárneo industrializado, pode ser obtido da carne moída dos animais, com subsequente adição ou não de gordura e outros ingredientes, moldado através de processos tecnológicos, tendo como resultado final um produto com características organolépticas intrínsecas (BRASIL, 2000). O valor nutricional e a praticidade do hambúrguer combinam com o modo de vida dos que habitam os centros urbanos, o que o torna um alimento representativamente popular (ROMANELLI & CASERI & LOPES FILHO, 2002). Entretanto, um inconveniente é que na superfície deste produto, podem se desenvolver microrganismos patogênicos, como coliforme a 45 °C, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva e *Clostridium* sulfito redutor a 46 °C, os quais podem ocasionar as DVA.

A polêmica em torno do uso dos conservantes químicos em alimentos ocorre devido à possível interação de tais substâncias com componentes dos alimentos, no processamento ou no metabolismo, que promovem, por sinergismo, a formação de componentes de maior toxicidade de ação carcinogênica, além de produzir vasodilatação e relaxamento da musculatura lisa em geral, enrubescimento da face e extremidades, desconforto gastrointestinal, dor de cabeça, cianose, náusea, vômitos, dores abdominais e colapso. Assim, como tentativa de reduzir os níveis dos aditivos químicos, pesquisas buscam nos compostos alternativos um emprego mais adequado dos conservantes, proporcionando maior qualidade de vida para os consumidores (MELO, 2004).

As técnicas de preservação mais modernas e naturais têm demonstrado um interesse pela segurança microbiológica através do uso de produtos naturais, dentre vários antimicrobianos, a quitosana têm obtido grande destaque por atender às perspectivas de mercado, e por apresentar características particulares como bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, reatividade do grupo amino desacetilado, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, capacidade de formar gel e filme, capacidade de quelação, e capacidade adsortiva.

A quitosana é um polissacarídeo encontrado na natureza, obtida por processo de baixo custo, produzida através dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos (AIDER, 2010). Exoesqueletos de crustáceos, principalmente de camarões, constituem a fonte comercial tradicional para a obtenção de quitina e quitosana. O conteúdo de quitina nos crustáceos varia com a espécie, estando o rendimento entre 2 a 12% da massa corpórea total. A quitosana é obtida pela desacetilação da quitina utilizando NaOH 50% e altas temperaturas (THARANATHAN; KITTUR, 2003).

Dessa forma, a aplicabilidade da quitosana na indústria, apresenta uma série de funções desejáveis, uma vez que permite a manutenção da qualidade microbiológica e química, além de que sua produção estimula o efetivo aproveitamento de subprodutos (carapaça de crustáceo), proporcionando um importante impacto social e ambiental.

Diante do exposto a presente pesquisa tem por objetivo verificar a estabilidade de hambúrguer adicionado de quitosana durante o armazenamento.

2. Material e métodos

2.1 OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DA QUITOSANA

A quitosana de peso molecular médio foi obtida através da Sigma-Aldrich®, a qual utiliza como fonte produtora a carapaça de crustáceo. Para a obtenção do gel da quitosana, o polímero foi diluído em ácido acético 1%, tendo como concentração final 20mg/mL-1. O gel de quitosana teve seu pH ajustado para 5,8, utilizando hidróxido de sódio 1N.

2.2 PRODUÇÃO DOS HAMBÚRGUERES

Para realização das análises, foram elaborados 4 tipos de amostras. Hambúrguer Controle (C), hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana (Q_{2.5}), hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana (Q_{5.0}) e hambúrguer comercial (H). Para elaboração das amostras C, Q_{2.5} e Q_{5.0}, a carne foi adquirida em frigorífico na Cidade de Recife, refrigerada, sendo acondicionada em recipientes térmicos e levada ao laboratório. Para elaboração da amostra H, foram adquiridos hambúrgueres comerciais em supermercado local.

A produção dos hambúrgueres (C, Q_{2.5} e Q_{5.0}) foi realizada em sala asséptica, bancadas e instrumentos foram devidamente higienizados. Na carne, foram retiradas as aparas e excessos de gordura com o auxílio de faca, cortada em cubos e triturada em multiprocessador industrial. Após obtenção da carne moída, a mesma recebeu a adição dos ingredientes e foi misturada até a obtenção de uma massa homogênea. Em seguida, as amostras foram adicionadas de gel de quitosana, exceto a amostra controle. Para obtenção das diluições do gel de quitosana a 2,5 e 5mg.mL⁻¹, utilizou-se a seguinte fórmula: $C1 \times V1 = C2 \times V2$, onde C1 foi a concentração inicial do gel de quitosana, V1 o volume inicial do gel de quitosana, C2 a concentração final do gel de quitosana e V2 o volume final do hambúrguer. Em seguida as amostras foram porcionadas para avaliação da estabilidade do hambúrguer adicionado de gel de quitosana durante o armazenamento, foram moldados hambúrgueres

com 40g. Todas as amostras foram armazenadas à -18°C . A tabela 1 mostra os ingredientes de cada formulação.

2.3 AVALIAÇÃO DE ESTABILIDADE DO HAMBÚRGUER ADICIONADO DE QUITOSANA DURANTE O ARMAZENAMENTO

Para análise da vida de prateleira foram preparadas as seguintes amostras: Hambúrguer Controle sem adição do gel de quitosana (C), Hambúrguer com de 2,5 mg/mL de gel de quitosana (Q2.5), Hambúrguer com 5 mg/mL de gel de quitosana (Q5.0) e hambúrguer comercial (H).

Foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas e análise sensorial mensalmente durante o período de 4 meses. A cada 30 dias foram realizadas primeiramente as análises microbiológicas e em seguida as demais análises. Os hambúrgueres foram descongelados em refrigeração para a realização das análises.

Análises microbiológicas

Foram realizadas análises de Coliformes a 45°C /g, Estafilococcus coagulase positiva /g, Clostridium Sulfito redutor a 46°C /g, Salmonella sp/25g, em cumprimento a legislação em vigor (BRASIL, 2001).

Análise físico-química

Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas dos hambúrgueres: Atividade de água instrumental aparelho (Decagon CX-2), pH, Umidade determinada por gravimetria em estufa a 105°C até peso constante da amostra (AOAC, 2002); Resíduo mineral fixo (cinzas) obtido mediante carbonização em chama e calcinação em mufla a 550°C até peso constante (AOAC, 1996); o teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet (AOAC, 963.15-31.4.02); Proteínas determinadas pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) e rancidez (Adolfo Lutz, 1985). Os carboidratos calculados por diferença.

A cor instrumental foi determinada utilizando um espectrofotômetro de reflectância (CR-400, Konica Minolta Sensing, Japão) com sistema CIE Lab que consiste em três componentes de cores: (L*) luminosidade, que varia de 0 (preto) a 100 (branco), (a*), que varia de verde (negativo) a vermelha (positivo) e (b*), que varia de azul (negativo) a amarela (positivo) (CIE, 2004). O ajuste do

equipamento foi realizado previamente as aferições, de acordo com as instruções do fabricante, e as aferições foram realizadas no centro do hambúrguer, em duplicata e ângulo observador de 10° foi o utilizado e com o iluminante D65.

Análise sensorial dos produtos

Foram recrutados 100 consumidores de hambúrgueres e solicitado que indicassem em escala hedônica de 9 pontos o seu julgamento em relação à aceitação do produto, atribuindo nota 9 para gostei extremamente e 1 para desgostei extremamente (Minim, 2013), além do teste de ordenação para avaliar preferência e intenção de compra. Para preparação da amostra, os hambúrgueres foram descongelados sob refrigeração (4°C), fritos em óleo de soja a 180°C por aproximadamente 8 minutos, sendo o excesso de óleo retirado com o auxílio de papel toalha. Na avaliação dos produtos, as amostras com gel de quitosana (2,5 e 5mg/mL-1) e sem gel de quitosana, foram expostas de forma mais homogênea possível, servidas aos provadores em cabines individuais iluminadas com luz branca, à temperatura de 24°C, em pratos descartáveis, aleatoriamente codificadas com três dígitos, sendo intervaladas com copo de água para o enxágue do resíduo da amostra anterior, bolacha para limpeza do paladar e pó de café para neutralização do odor, de forma que fosse possível o provador expressar as características sensoriais reais encontradas nos diferentes produtos.

Considerações éticas

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Pernambuco, estando o mesmo aprovado através do Registro CEP 1.285.277. A participação dos voluntários na pesquisa foi voluntária e condicionada a leitura e assinatura de um Termo de Consentimento Livre Esclarecido, conforme a Resolução 466/12 da CONEP.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (One Way Analysis of Variance – ANOVA, seguida do Teste de Duncan), para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos aplicados. Para o tratamento estatístico utilizou-se o software statistic for windows 7.0.

3. Resultados e discussão

Os resultados das análises microbiológicas das amostras atestaram a viabilidade da execução da análise sensorial, uma vez que os parâmetros de ausência de *salmonella sp/25g*, máximo de 5×10^3 UFC/g de Coliformes a 45°C/g, 5×10^3 UFC/g de *Staphylococcus coagulase positiva/g* e 3×10^3 UFC/g de *Clostridium Sulfito redutor* a 46°C/g foram mantidos, segundo exigido pela RDC nº12 (BRASIL, 2001) durante todo o armazenamento.

Na tabela 02 estão os resultados das análises físico-químicas realizadas a cada 30 dias durante os 120 dias de armazenamento.

Os valores de umidade encontrados demonstram que as amostras contendo gel de quitosana apresentaram percentuais superiores às amostras sem o gel, sendo a amostra Q_{5.0} a que apresentou os maiores percentuais, por apresentar a maior concentração gel de quitosana. Cé (2009) ao incorporar filme de quitosana em morango também encontrou um maior valor de umidade nas suas amostras. Damian 2005, ao avaliar a composição de salsicha adicionado de quitosana, observou aumento da umidade devido a inclusão do gel, assim como Sousa et al. (2012), ao testar nova formulação de hambúrguer, também encontrou aumento na umidade do produto.

Ferreira, et al. (2003) relataram que o teor de gordura é inversamente proporcional ao de umidade. Em experimentos relacionados com a elaboração de salsichas, observaram que, à medida que aumentaram o teor de gordura no produto, houve uma redução no percentual de umidade. Resultados semelhantes foram observados por Hughes, Cofrades e Stroy (1997) ao produzirem salsichas com 5, 12 e 30 % de gordura, obtiveram resultados relacionados com os teores de umidade equivalentes a 75, 67 e 51 %, respectivamente.

. Os valores de cinzas obtidos alteraram ao longo do tempo e entre as amostras durante todo o período de armazenamento. Os valores observados nas amostras Q_{2.5} e Q_{5.0} foram inferiores aos das amostras C e H, variando entre 1,55% e 2,38%, resultados esses semelhantes ao citado pela literatura (TACO, 2011) para hambúrguer bovino cru, no qual apresenta 2,9g/100g de cinzas. Marques (2007) em seu trabalho obteve resultados semelhantes para cinzas, valores que variaram de 2,58% a 2,90% em estudo com produtos tipo hambúrguer bovino adicionado de farinha de aveia.

Os valores encontrados para a proteína nas 04 amostras analisadas estão próximos aos 15% que a legislação, entretanto, vale salientar que as amostras que apresentaram valores inferiores ao preconizado, foram semelhantes aos produtos industrializados. Os maiores valores

encontrados foram (19,04) na amostra C, e os menores na amostra H (13,96) e Q5 (14,16). Estes resultados corroboram com Damian 2005, que ao incluir maiores percentuais de quitosana, também observou redução no valor protéico do produto final.

Ao analisar os valores de proteína para cada amostra, observa-se que em todas as amostras, ao longo do armazenamento, estes sofreram pequenas variações. Tais resultados corroboram com os achados de Machado (2009), que ao estudar o efeito do congelamento e estocagem sobre a qualidade da carne bovina, também demonstrou que ao longo do período de armazenamento (120 dias) não ocorre diferença entre os percentuais de proteína.

Ainda na tabela 02, encontramos os percentuais de lipídeos das amostras durante o armazenamento. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Leonardi et al. (2009), quando avaliou a composição nutricional de hambúrgueres e almôndegas e verificou o teor de lipídeos de 1,78%. Marques (2007) também obteve baixos teores de lipídeos para o seu produto (1,12%) ao avaliar hambúrguer de carne bovina adicionado de farinha de aveia e Sousa et al. (2012) obteve 0,13% de lipídeo em estudo com hambúrguer de carne bovina e soja texturizada adicionados de casca de melancia desidratada. Resultados superiores para lipídio foram encontrados por Damian (2005), ao avaliar a adição da quitosana em salsichas, obtendo o valor médio de 7.5%, entretanto, vale ressaltar que em tal estudo, a inclusão de maior percentual de quitosana, também ocasionou na redução do lipídio no produto final.

As diferenças dos resultados entre os estudos podem ser atribuídas a quantidade de gel de quitosana adicionado, diferentes formulações (produtos), como também à composição centesimal da carne de boi, que segundo Olivo (2004), varia de acordo com fatores extrínsecos como, alimentação, stress e idade do animal, o músculo de origem, teor de gordura e o tipo de corte o que pode interferir significativamente na composição do produto. Entretanto, todas as amostras obtiveram valores de lipídeos de acordo com a legislação vigente, que estabelece o máximo de 23%, apresentando um aumento gradativo nos valores em todas as amostras (BRASIL, 2000).

Outro achado importante deste estudo a partir dos resultados é que a inclusão do gel de quitosana reduziu o percentual de lipídeo das amostras Q_{2.5} e Q_{5.0} em mais de 25% em relação as amostras C e H. Segundo a legislação, a redução a partir de 25% de gordura pode caracterizar um produto como *light* em relação a outro convencional. Dessa forma, as amostras Q_{2.5} e Q_{5.0} mostram-se como uma versão *light* das amostras C e H. O fato das amostras Q_{2.5} e Q_{5.0} terem sido elaboradas isentas de aditivos químicos, somada à redução do percentual de gordura e

consequente redução calórica, torna os hambúrgueres adicionados de gel de quitosana, alimentos do ponto de vista nutricional, mais saudáveis que às amostras H e C. Essa questão torna-se ainda mais relevante quando analisamos o perfil dos consumidores de hambúrgueres, que na sua maioria são jovens e apresentam um alto consumo de alimentos com percentuais elevados de gordura e caloria, como constatado por Meira (2013) ao analisar o perfil do consumidor na atualidade.

Ao avaliar os valores de lipídios ao longo do tempo, observou-se que embora o teor de lipídeo tenha aumentado, nenhuma das amostras apresentou rancidez durante todo o período de armazenamento. Pesquisas apontam que o aumento do lipídio é devido ao processo de desintegração que ocorre na membrana das células da carne, devido à moagem, mudança de temperatura e interação com outros constituintes, favorecendo assim a oxidação lipídica, e aceleração deste processo (PEARSON & LOVE & SHORLAND, 1977; TORRES et al., 1998). Machado (2009), também observou um aumento na taxa de oxidação lipídica em carne moída ao longo dos 120 dias de estocagem sob congelamento, o que diferiu dos resultados encontrados.

Ferreira & Santos & Medeiros (2001) quando estudaram as alterações oxidativas de hambúrgueres de carne bovina armazenados sob diversas temperaturas de congelamento concluiu que o surgimento do ranço oxidativo em hambúrguer é inversamente proporcional a temperatura de armazenamento uma vez que os resultados demonstraram que o ranço pronunciado foi detectado depois de 15 dias de armazenamento a temperatura de -1°C , 30 dias de armazenamento à -8°C e à -18°C somente a partir de 90 dias.

Esses resultados apontam que o baixo valor de gordura utilizado nas amostras, somado a adição dos antimicrobianos naturais podem ter auxiliado no efeito protetor evitando assim a oxidação lipídica. Darmadji & Izumimoto (1994) observaram que a oxidação lipídica da carne armazenada a 4°C durante 10 dias foi reduzida com a adição de quitosana. Kanatt & Chamder & Sharma (2004) também observaram resultados semelhantes ao incorporar a quitosana na carne de cordeiro submetida ao processo de radiação, alegando seu efeito como agente de controle da oxidação lipídica. Em contra partida Igene et al. (1979), quando avaliou os valores de TBA para carne bovina congelada, pelo método de destilação, observou que houve aumento na rancidez. Stika & Xiong & Suman (2007) observaram um aumento significativo nos valores de TBA da carne bovina com o decorrer da estocagem sob uma temperatura de congelamento de -29°C .

Os percentuais de carboidratos dos hambúrgueres adicionados de gel de quitosana estão acima do recomendado pela legislação vigente, que estabelece o percentual máximo de 3%. Valores também superiores a legislação foram encontrados por outros autores, em estudo (TAVARES *et al.*, 2007) utilizando hambúrguer de coelho, com 8,9% de carboidrato, e hambúrguer de caju com 18% (LIMA, 2008). Segundo García *et al.* (2002), uma vantagem no elevado valor de carboidrato encontrado, está na capacidade de retenção de água, uma vez que as fibras e os carboidratos melhoram o rendimento durante o cozimento e realçam a textura.

Os valores elevados encontrados nas amostras Q_{2,5} e Q_{5,0}, eram esperados uma vez que as amostras apresentaram valores baixos no quesito gordura, quando comparada a outras formulações, contribuindo para um aumento na proporção de carboidrato, já que este foi calculado por diferença. Em contraposição Leonardi *et al.* (2009) observou valores inferiores de carboidrato em hambúrguer de carne bovina.

Tais características conferem ao hambúrguer bovino adicionado de gel de quitosana diversas vantagens nutricionais, uma vez que possui alto teor de carboidrato e baixos valores de lipídeos, caracterizando o produto como uma alternativa de alimentação para grupos da população que estão em busca de um produto menos calórico.

Na tabela 03 podemos verificar que os valores de *A_w* encontrados nas amostras variaram de 0,972 e 0,982. Esses valores são considerados altos, porém não influenciaram na conservação dos hambúrgueres, uma vez que estes foram conservados congelados. Esses resultados estão próximos dos achados de Marques (2007), que verificou um valor de 0,98 – 0,97 de atividade de água para hambúrguer bovino.

Em relação ao pH, observamos na tabela 04 que os valores de pH encontrados variaram entre 6,26 e 5,09, corroborando com o pH da carne bovina, com valores em torno de 7 (Roca, 2001). Sobreiro & Souza (1996) quando avaliaram o estado de conservação de carne bovina moída preparada industrialmente, encontraram resultados similares com os achados desta pesquisa, onde os valores de pH encontrados pelos autores foram entre 5,67 e 5,51. Os menores valores encontrados foram em Q_{5,0} (5,09), fato este atribuído ao maior percentual de gel de quitosana presente na amostra, uma vez que foi preparado com ácido acético.

No final do período de armazenamento, todas as amostras apresentaram elevação de pH, exceto a C. Segundo Roca (2001) o pH da carne após 24 horas varia de 5,5 - 5,9, devido ao processo de glicólise lenta. Resultados contraditórios foram encontrados por Gokalp *et al.* (1978),

onde o pH foi constante em todo tempo de estocagem da carne bovina estocada congelada, durante 9 meses, a $-22,3^{\circ}\text{C}$. Machado (2009) ao observar a carne bovina (contrafilé), encontrou ligeira queda do pH aos 120 dias de estocagem (-18°C).

Na figura 01 são apresentados os resultados de cor das amostras ao longo dos 4 meses de armazenamento. Apesar de serem observadas variações de valores durante o armazenamento com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), não foi observado tendência de redução ou aumento nos valores, nas amostras C, $Q_{2.5}$ e $Q_{5.0}$, caracterizando escurecimento ou clareamento das amostras. Portanto as alterações de cor observadas são provavelmente devido a problemas na homogeneidade das amostras, visto que foram elaboradas manualmente. Apenas a amostra H, elaborada industrialmente, mostrou uma tendência de escurecimento, com redução da luminosidade (L^*) e das cores cromáticas (a^* e b^*).

Nas figuras 02 e 03 podemos observar os resultados da avaliação da textura instrumental. No tempo 0 a amostra H foi a que apresentou a maior média de força aplicada no teste de penetração (265gf), seguida pela amostra $Q_{2.5}$, C e $Q_{5.0}$, porém no final do armazenamento esta amostra apresentou a menor força aplicada, mostrando um amolecimento com o passar do tempo. Entre as amostras com adição do gel de quitosana, podemos observar o inverso, ou seja, as amostras mostraram-se mais consistentes. Este resultado pode ser atribuído a perda de umidade maior ocorrida nas amostras com quitosana.

Na amostra com maior concentração do gel (5.0mg.mL^{-1}), a força aplicada no tempo 0 e no final do armazenamento foram 145gf e 235gf, respectivamente. Esses valores foram inferiores às forças aplicadas na amostra com menor concentração do gel (2.5mg.mL^{-1}), sendo estas 235gf (0dias) e 330gf (120dias).

Na tabela 5 esta demonstrado o resultado da avaliação dos atributos sensoriais de aparência, cor, odor, sabor e textura.

Em relação a aparência não houve diferença significativa em todos os tempos entre as amostras, demonstrando que as mesmas se encontravam uniformes. Resultados positivos no quesito aparência, também foi encontrado por Dotto et al. (2008), ao avaliar a aplicação de filmes de quitosana em mamão. Han et al. (2004) e Park (1999) observaram a aplicação concomitante de quitosana em diferentes alimentos, e afirmaram que a presença deste antimicrobiano pode contribuir de forma eficiente na promoção do tempo de vida útil em frutas frescas, protegendo o produto de alterações deteriorantes, o que poderia ser responsável por alterações visuais.

No atributo cor, as amostras contendo gel de quitosana não apresentaram diferença significativa durante todo o período de armazenamento. A cor de um produto, segundo Osório, Osório & Sañudo (2009) é o primeiro atributo que o consumidor analisa no ato da compra, uma vez que a visão é o órgão responsável pela primeira sensação de aceitabilidade ou recusa. A partir desses dados, foi possível afirmar que houve uma estabilidade da cor das duas formulações com gel de quitosana.

Para o perfil sensorial de odor, os julgadores expressaram a mesma opinião, não observando nenhuma diferença perceptível entre o odor do produto controle e os que continham gel de quitosana. Botrel et al. (2007), ao utilizar a quitosana em alho minimamente processado também obteve resultado positivo quando recobriu o produto com o antimicrobiano. Outros resultados positivos foram relatados por Chien & Sheu & Lin (2007) com pitayas, e por Costa (2009) ao avaliar morangos revestidos à base de quitosana.

Na avaliação do atributo sabor, com exceção do tempo 30, não houve diferença significativa entre as amostras no decorrer do armazenamento, sendo a amostra Q_{5.0} a que recebeu as menores notas em todos os tempos. Esse fato pode ser atribuído a maior concentração de gel de quitosana presente nesta amostra, o que pode ter provocado um sabor residual decorrente da presença de ácido acético. Em estudo semelhante, Han et al. (2005) ao pesquisarem o emprego da quitosana no armazenamento de morangos, relataram adstringência e amargura no sabor das frutas, o que foi atribuído às soluções ácidas que são utilizadas para dissolução da quitosana. Em contrapartida, Matos (2000) obteve melhores resultados ao adicionar quitosana em bebida aguardente.

No atributo textura, na maior parte do armazenamento não houve diferença significativa entre as amostras, porém assim como no atributo sabor, a amostra Q_{5.0} recebeu as menores notas. A presença do gel de quitosana provavelmente causou um amolecimento da amostra, fato este perceptível tanto na avaliação sensorial como na análise de textura instrumental, quando o Q_{5.0} apresentou as menores forças aplicadas para penetração. Resultados diferentes foram relatados por Damian (2005) ao estudar salsichas frankfurt, contendo quitosana, quando observou que as características sensoriais de textura não foram alteradas, quando comparado salsichas controle e com antimicrobiano, fato que pode ser justificado devido a quitosana ter sido incorporada como cobertura, e não adicionada junto ao alimento.

Ao avaliarmos o comportamento de cada amostra ao longo do tempo de armazenamento, observamos que a ausência de diferença significativa predominou, sendo o tempo 0 o que mais diferiu. Sugere-se com esse resultado que a inclusão do gel de quitosana foi mais percebido no tempo 0 por neste tempo as amostras não terem sido congeladas, atribuindo ao congelamento a função de melhoria na rigidez, adesão e homogeneidade, característicos do hambúrguer.

Ao avaliar de maneira global todos os atributos, amostra Q_{2.5} recebeu as melhores notas para todos os atributos avaliados (aparência, cor, odor, sabor e textura) e na maioria dos tempos analisados, o que torna essa concentração uma alternativa viável sensorialmente para uso em alimentos. Apesar disso, estudos com quitosana apontam como uma substância benéfica e segura para o consumo humano, por apresentar uma toxicidade menor do que a glicose ou sacarose. Em mamíferos a dose letal de glicose é da ordem de 8 a 12 gramas enquanto que 18 gramas de quitosana por quilograma de massa corporal não apresenta qualquer sinal de toxicidade ou mortalidade (CRAVEIRO et al., 1999; YADAV & BHISE, 2004).

Ao analisarmos a intenção de compra dos hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana, podemos verificar na figura 04 que os percentuais de julgadores que certamente comprariam e que provavelmente comprariam foram maiores em todos os tempos analisados para as amostras C e Q_{2.5}. Em contraposição ao visto em relação a amostra Q_{5.0}, quando os julgadores na sua maioria teriam dúvida se comprariam, provavelmente não comprariam ou certamente não comprariam. Esse comportamento dos julgadores corroborou com os resultados obtidos na análise dos atributos sensoriais, quando a amostra Q_{5.0} recebeu as menores notas, como também com o teste de ordenação de preferência mostrado na tabela 06, quando o Q_{2.5} foi a amostra preferida entre os julgadores.

Evidências científicas também têm respaldado a inclusão da quitosana em alimentos, sem grandes alterações sensoriais, através de sua atuação como base na fabricação de suplementos nutricionais, emulsificantes, conservantes, fibras em biscoitos dietéticos, estabilizantes em alimentos em conservas, clarificantes de bebidas (SHAHIDI et al., 1999; BORGOGNI et al., 2006; LI et al., 2007; DAMIAN, 2005). Produtos de origem animal como bacalhau (SHAHIDI et al., 2002), carne de cordeiro (KANATT et al., 2004), salsicha (DAMIAN, 2005), mortadela (CHI et al., 2006), patê de carne (BENTO et al., 2011), são algumas pesquisas que reforçam a eficácia desse antimicrobiano natural com qualidade e aceitabilidade.

4. Conclusão

Hambúrgueres adicionados de quitosana apresentaram estabilidade durante o período de armazenamento. Não ocorreram alterações prejudiciais às características organolépticas e microbiológicas devido a interação da quitosana com os demais constituintes dos hambúrgueres. Desta forma, hambúrgueres adicionados de quitosana apresentam segurança microbiológica, nutricional e sensorial durante o período de 120 dias de armazenamento à temperatura de -18°C.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Pernambuco pelo apoio financeiro e disponibilidade da infraestrutura para a realização dos experimentos.

REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT – Food Science and Technology*, v.43, p.837-842, 2010.
- AOAC, Association Of Official Analytical Chemistry. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry Internacional* 16 ed., 1995.
- AOAC, Association Of Official Analytical Chemistry. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry Internacional*. 17th edition, v.2. 98529 (45.4.07), 2002a.
- AOAC, Association Of Official Analytical Chemistry. *Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemistry Internacional*. Cap.44 (900.02), 1996.
- BOTREL, D. A. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. *Revista de Ciência e Tecnologia Alimentar*, v.27, n.1, p.32-38, 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Ministério da agricultura e do abastecimento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Hambúrguer. Brasília, 2000. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 05 abr. 2012.
- CÉ, N. Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de kiwis morangos minimamente processados. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de

- alimentos). Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2009.
- CHIEN, P.J., SHEU, F. & LIN, H.R. Quality assessment of low molecular weight chitosan coating on sliced red pitayas. *Journal of Food Engineering*, v.79, n.2, p.736-740, 2007.
- COSTA, F.B. Fisiologia e conservação de cultivares de morangos inteiros e minimamente processados. Tese - (Doutorado em Fisiologia Vegetal). Universidade Federal de Viçosa, MG, 2009.
- DAMIAN, C. Efeito da quitosana na digestibilidade aparente da gordura e na qualidade de salsichas Frankfurt. 2008. Tese (Doutorado). Florianópolis, Brasil.
- DARMADJI, P.; IZUMIMOTO, M. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, Japan, v. 38, n. 2, p. 243-254, 1994.
- DOTTO, G.; GREVINELI, A.; OLIVEIRA, A.; PONS, G.; PINTO, L. Uso de quitosana como filme microbiológico para o aumento da vida útil de mamões papaia. Escola de Química e Alimentos – Núcleo de Engenharia de Alimentos – Rio Grande-RS. 2008. XVII Congresso de Iniciação Científica.
- FERREIRA, F. C; SANTOS, N. N.; MEDEIROS, L. M. Vida de prateleira de hambúrguer: avaliação físico-química com relação ao ranço. *Hig. aliment*;15(86):61-4, jun. 2001.
- GARCÍA, M.L.; DOMINGUEZ, R.; GALVEZ, M.D.; CASAS, C.; SELGAS, M.D. Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented. *Meat Science*, v.60, n. 3, p. 227-236, mar. 2002.
- GOKALP, H. Y.; OCKERMAN, H. W.; PLIMPTON, R. F. Effect of different packaging on objective quality characteristics of frozen and stored cow beef. *Journal of Food Science*, v.43, p. 297-300, 1978.
- HAN, C.; LEDERER, C.; MCDANIEL, M.; ZHAO, Y. Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. *J. Food Sci.* v.70, p.172-178, 2005.
- HAN, C.; ZHAO, Y.; LEONARD, S.W.; TRABER, M.G. Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.33, p.67–78, 2004.
- IGENE, J. O.; PEARSON, A. M.; MERKEL, R. A.; COLEMAN, T. H. Effect of frozen storage time, cooking and holding temperature upon extractable lipids and TBA values of beef and chicken. *Journal of Animal Science*, v. 49, n. 3, p. 701-707, 1979.

- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. 317p.
- KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Effect of irradiated chitosan on the rancidity of radiation-processed lamb meat. *International Journal of Food Science and Technology*, v.39, n.9, p. 997-1003, nov. 2004.
- LEONARDI, D.S.; FERES, M.B.C.; PORTARI, G.V.; JORDÃO, A.A. Determinação do valor energético de hambúrgueres e almôndegas através da calorimetria direta e da composição centesimal. Comparação com informações nutricionais apresentadas nas embalagens. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 25, n. 5, p. 141-148, Sept./Oct. 2009.
- LIMA, J.R. Caracterização físico-química e sensorial de hambúrguer vegetal elaborado à base de caju. *Ciênc. agrotec.*, (Impr.);32(1):191-195, jan.-fev. 2008.
- MACHADO, M. M. Efeito do congelamento e estocagem sobre a qualidade da carne bovina. 2009. 41f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária)- Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.
- MARQUES, J. M. Elaboração de um produto de carne bovina “tipo hambúrguer” adicionado de farinha de aveia. 2007. 55f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná Curitiba, 2007.
- MATOS, J.H.G. Utilização de Biopolímeros Quitina e Quitosana, Derivados de Caranguejo-uça (*Ucides cordatus*) na redução de Cobre Contaminante da Aguardente Aguardente de Cana. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, 2000.
- MELO FILHO, A. B., BISCONTINI, T. M. B., ANDRADE, S. A. C. Level nitrite and nitrate in sausages commercialized in metropolitan region of Recife. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* vol. 24, no. 3, pp. 390-392, 2004.
- MINIM, V.P.R. Análise sensorial: Estudos com consumidores. 3.Ed. Viçosa: UFV, 2013.
- OLIVO, R. Carne bovina e saúde humana. 332 ed. *Revista Nacional da Carne*, Outubro, 2004, p.332.
- OSÓRIO, J.C.S.; OSÓRIO, M.T.M.; SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.38, p. 292-300, 2009.
- PARK, H. J. Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science and Technology*, Oxford, v.10, n. 8, p.254-260, 1999.

- PEARSON, A.M.; LOVE, J.D.; and SHORLAND, F.B. Warmed-overflavor in meat, poultry and fish. *Adv. Food Res.*, 23:1, 1977.
- ROCA, R. O. Modificações post-mortem. Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. UNESP - Campus de Botucatu. 2001.
- ROMANELLI, P. F., CASERI, R., LOPES FILHO, J. F. Processamento da Carne de Jacaré do Pantanal (*Caiman crocodilus yacare*). 2002. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 1, p. 70-5, 2002.
- SOBREIRO, L. G.; SOUZA, E. R. Avaliação físico-química e organoléptica do estado de conservação de carne bovina moída, preparada industrialmente. *Revista Brasileira Ciência Veterinária*, Niterói, v.3, n.3, p.99-104, 1996.
- SOUSA, E. P.; MORI, E.; LEMOS, D. M.; SOUSA, F. C. Análise química da formulação de hambúrguer enriquecido com fibras da casca de melancia desidratadas. *Revista verde, Mossoró*, v.7, n.1, p. 96 – 101, jan. 2012.
- STIKA, J. F.; XIONG, Y. L.; SUMAN, S. P. Frozen storage stability of antioxidant-treated raw restructured beef steaks made from mature cows. *Meat Science*, v. 7, n.4, p. 562-569.dez. 2007.
- TACO, Tabela Brasileira de Composição de alimentos/ NEPA- UNICAMP – Versão IV. Campinas: NEPA- UNICAMP, P.105, 2011.
- TAVARES, R.deS.; CRUZI, A.G.da; OLIVEIRA, T.S.de; BRAGA, A.R.; REIS, F.A.dos; HORA, I.M.C.da; TEIXEIRA, R.daC.; FERREIRA, E.F. Processamento e aceitação sensorial do hambúrguer de coelho (*Orytolagus cunicullus*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(3): 633-636, jul.-set. 2007.
- THARANATHAN, R. N., KITTUR, F. S. Chitin —The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.43, p.61–87, 2003.
- TORRES, E. A. F. S.; RIMOLI, C. D.; OLIVO, R.;HATANO, M. K.; SHIMOKOMAKI, M. Papel do sal iodado na oxidação lipídica em hambúrgueres bovino e suíno (misto) ou de frango. Fev.1998. Disponível em<
http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos_de_comunicacao/CTA/VO_L18N1/CTA18N1_09.PDF> acessado em: 08/07/14.

Tabela 1: Ingredientes e respectivas quantidades utilizadas na produção dos hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana.

MATÉRIA-PRIMA	FQ_{2.5}*	FQ_{5.0}**	FC***
Carne bovina	100g	100g	100g
Coentro	5g	5g	5g
Pimenta do reino	0,01g	0,01g	0,01g
Açúcar	3g	3g	3g
Cebola	5g	5g	5g
Sal	1,5g	1,5g	1,5g
Farinha de trigo	10g	10g	10g
Óleo	-	-	5 ml
Gel de Quitosana	12,5ml	25ml	-

*FQ_{2.5} - Formulação de hambúrguer com gel de quitosana na concentração de 2,5mg/ml

**FQ_{5.0} - Formulação de hambúrguer com gel de quitosana na concentração de 5mg/ml

***FC - Formulação de hambúrguer Controle

Tabela 02: Análise físico-química de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.

	DIAS					
	PRODUTOS	0	30	60	90	120
UMIDADE (%)	H	67,34±0,36Bc	67,63±0,24Bc	67,29±0,04Bc	67,18±0,12Bc	68,54±0,21Ac
	C	67,43±0,09ABc	67,67±0,14Ac	67,64±0,08Ac	67,65±0,28Ac	67,17±0,18Bd
	Q_{2.5}	74,44±0,51Ab	74,07±0,18Ab	73,74±0,30ABb	73,25±0,28Bb	73,00±0,14Bb
	Q_{5.0}	76,88±0,18Aa	76,76±0,12Aa	76,16±0,09Ba	75,60±0,07Ca	75,87±0,11BCa
CINZAS (%)	H	2,28±0,02Ba	2,38±0,03Aa	2,18±0,05Ca	2,46±0,03Aa	2,28±0,03Ba
	C	1,90±0,07Bb	2,05±0,06Bb	2,06±0,05Bb	2,38±0,03Ab	2,05±0,07Bb
	Q_{2.5}	1,69±0,01Bc	1,79±0,01Ac	1,80±0,01Ac	1,77±0,01Ac	1,78±0,01Ac
	Q_{5.0}	1,57±0,01Bd	1,55±0,02Bd	1,57±0,01Bd	1,64±0,01Ad	1,55±0,01Bd
PROTEÍNAS (%)	H	14,56±0,01Ac	14,37±0,01Bb	14,20±0,01Cd	14,32±0,03Bd	13,96±0,03Dd
	C	19,04±0,08Aa	17,76±0,02Ba	17,12±0,04Ca	17,84±0,03Ba	18,57±0,03Da
	Q_{2.5}	15,36±0,02Ab	14,28±0,02Db	14,91±0,01Cc	15,03±0,03Bb	15,05±0,03Bc
	Q_{5.0}	14,16±0,02Ed	14,96±0,05Cc	15,29±0,01Bb	14,74±0,03Dc	15,70±0,01Ab
GORDURA (%)	H	14,19±0,02Ba	13,90±0,02Ca	14,67±0,03Aa	14,68±0,01Aa	14,70±0,01Aa
	C	4,19±0,03Eb	5,33±0,03Bb	5,84±0,02Ab	5,22±0,03Cb	5,13±0,03Db
	Q_{2.5}	1,84±0,01Dc	1,50±0,02Ec	2,22±0,01Cc	3,12±0,03Bc	3,70±0,01Ac
	Q_{5.0}	1,36±0,01Ed	1,50±0,01Dc	2,13±0,02Cd	2,82±0,03Bd	3,27±0,01Ad
CARBOIDRATO (%)	H	1,92±0,01Ad	1,92±0,01Ad	1,77±0,03Bc	1,51±0,03Cd	0,75±0,04Dd
	C	7,65±0,04Aa	7,40±0,06Bb	7,50±0,05Ba	7,15±0,03Cb	7,26±0,03Ca
	Q_{2.5}	7,08±0,03Db	8,51±0,02Aa	7,59±0,03Ba	7,31±0,03Ca	6,63±0,03Eb
	Q_{5.0}	6,20±0,03Ac	5,35±0,01Dc	4,97±0,01Bb	5,03±0,05Bc	3,73±0,02Cc
VCT (calorias)	H	193,65±0,34Ba	190,35±0,25Ca	195,61±0,85Aa	195,48±0,41Aa	191,14±0,41Ca
	C	144,49±0,73Db	148,65±0,59Bb	151,11±0,56Ab	147,01±0,35Cb	149,51±0,23Bb
	Q_{2.5}	106,36±0,35Dc	104,75±0,36Dc	110,00±0,32Cc	116,09±2,39Bc	120,02±0,35Ac
	Q_{5.0}	93,72±0,35Cd	94,66±0,01Cd	100,22±0,36Bd	105,90±1,25Ad	107,17±0,27Ad

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na horizontal no mesmo produto e na mesma análise, não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Duncan.

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na vertical na mesma análise e no mesmo dia de armazenamento não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Duncan.

Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2.5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana, Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e VCT= Valor Calórico Total.

Tabela 03: Valores de Aw de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.

	DIAS					
	PRODUTOS	0	30	60	90	120
Aw	H	0,976±0,001Ba	0,975±0,001BCbc	0,978±0,001Aa	0,975±0,001BCc	0,974±0,001Cd
	C	0,974±0,001Cb	0,974±0,001Cc	0,972±0,001Db	0,976±0,001Bc	0,978±0,001Ac
	Q_{2.5}	0,976±0,001Ca	0,976±0,001Cab	0,978±0,001Ba	0,980±0,001Aa	0,980±0,001Ab
	Q_{5.0}	0,977±0,001Ba	0,977±0,001Ba	0,978±0,001Ba	0,978±0,001Bb	0,982±0,001Aa

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na horizontal no mesmo produto e na mesma análise, não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Ducan.

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na vertical na mesma análise e no mesmo dia de armazenamento não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Ducan.

Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2.5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Tabela 04: Valores de pH de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120dias.

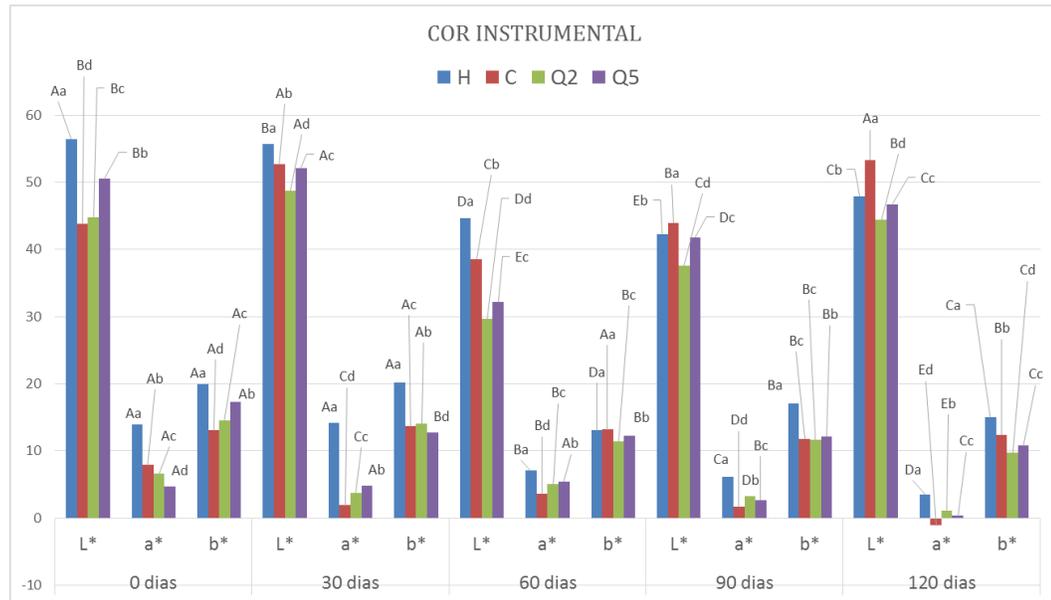
	DIAS					
	PRODUTOS	0	30	60	90	120
pH	H	6,17±0,01Ba	6,16±0,01Ba	6,15±0,01Ba	6,15±0,07Ba	6,26±0,01Aa
	C	5,54±0,02Ab	5,53±0,02Ab	5,54v0,01Ab	5,55±0,01Ab	5,57±0,01Ab
	Q_{2.5}	5,33±0,02Bc	5,33±0,02Bc	5,34v0,01Bc	5,35±0,01Bc	5,49±0,02Ac
	Q_{5.0}	5,17±0,01ABd	5,15±0,01BCd	5,13v0,01Cd	5,09±0,01Dd	5,19±0,01Ad

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na horizontal no mesmo produto e na mesma análise, não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Ducan.

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na vertical na mesma análise e no mesmo dia de armazenamento não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Ducan.

Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2.5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Figura 01: Avaliação da cor instrumental de hambúrguer com adição e sem adição de gel de quitosana armazenado à -18°C por 120 dias.

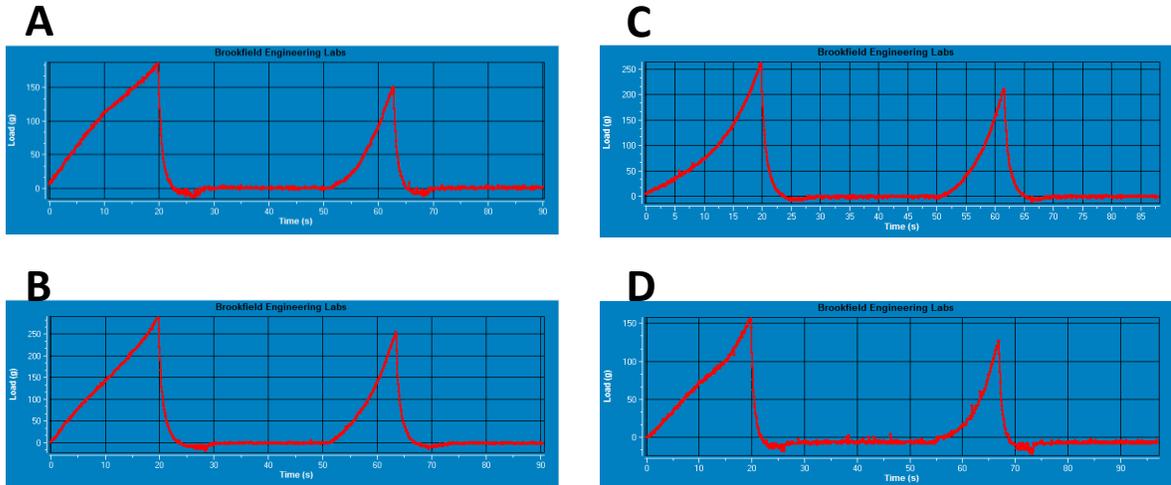


^{abc} médias seguidas de letras iguais no mesmo tempo de armazenamento e na mesma análise em produtos diferentes não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

^{ABC} médias seguidas de letras iguais em tempos diferentes de armazenamento e na mesma análise e no mesmo produto não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

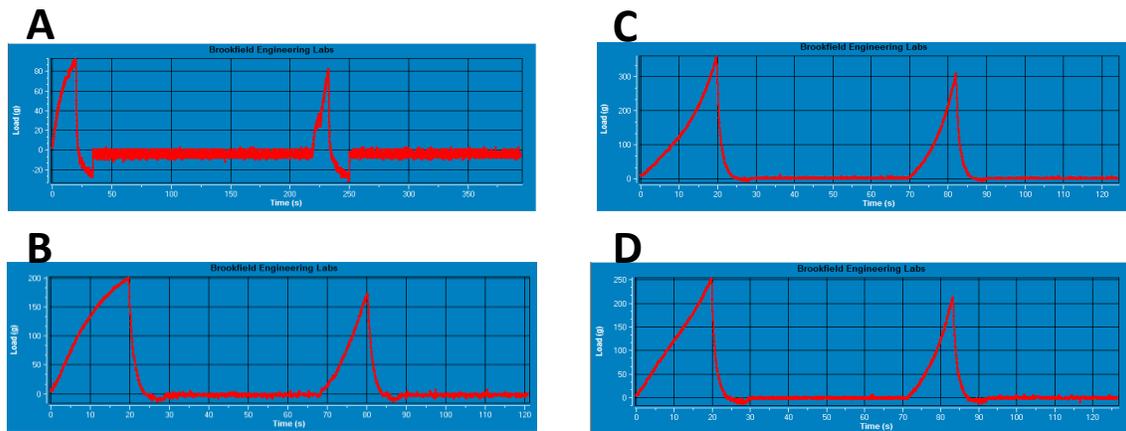
Onde: H= hambúrguer comercial, C= hambúrguer controle, Q_{2,5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Figura 02: Avaliação da textura instrumental de hambúrguer com e sem adição de gel de quitosana.



A (Hambúrguer Controle); B (Hamburguer Comercial); C (Hambúrguer com $2,5\text{mg/mL}^{-1}$ de gel de quitosana) e D (Hambúrguer com 5.0mg/mL^{-1} de gel de quitosana).

Figura 03: Avaliação da textura instrumental de hambúrguer com e sem adição de ge de quitosana armazenado à -18°C por 120 dias.



A (Hambúrguer Controle); B (Hamburguer Comercial); C (Hambúrguer com $2,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de gel de quitosana) e D (Hambúrguer com $5.0\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de gel de quitosana).

Tabela 5: Média das notas dos julgadores aos atributos sensoriais de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120dias.

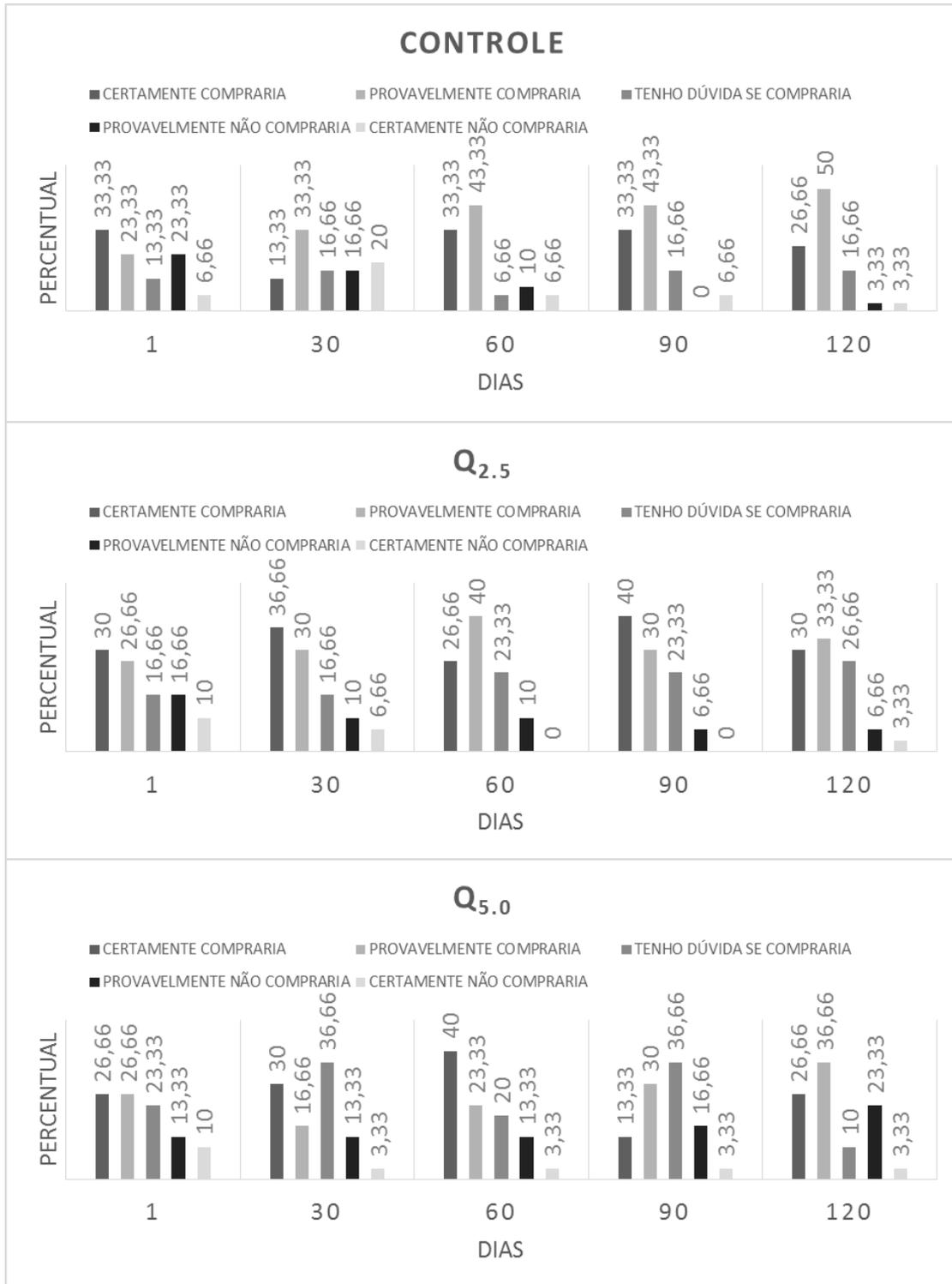
ATRIBUTOS	DIAS					
	PRODUTOS	1	30	60	90	120
APARENCIA	C	7,30±1,64Aa	6,70±1,86Aa	7,03±2,23Aa	7,67±0,99Aa	6,93±2,27Aa
	Q_{2.5}	7,53±1,61Aa	7,20±1,32Aa	7,53±1,59 Aa	7,0±1,74Aa	6,90±1,73Aa
	Q_{5.0}	7,33±1,93Aa	7,10±1,54Aa	7,20±1,47Aa	7,40±1,30Aa	6,80±2,14Aa
COR	C	7,33±1,65ABa	6,70±1,68Ba	7,10±1,94 ABa	7,90±1,03Aa	7,53±1,41ABa
	Q_{2.5}	7,77±1,61Aa	7,30±1,37Aa	7,53±1,45Aa	7,10±1,65Ab	7,40±1,79Aa
	Q_{5.0}	7,37±1,75Aa	7,40±1,43Aa	7,27±1,62 Aa	7,33±1,60Aab	7,07±1,85Aa
ODOR	C	6,93±1,76Aa	6,73±1,96Aa	7,43±1,54 Aa	7,57±1,36Aa	7,43±1,38Aa
	Q_{2.5}	7,10±1,75Ba	7,27±1,76ABa	7,97±0,89Aa	7,90±1,27ABa	7,17±1,55ABa
	Q_{5.0}	6,93±2,05Aa	7,50±1,50Aa	7,87±1,43Aa	7,33±1,62Aa	7,10±1,65Aa
SABOR	C	6,97±1,92ABa	6,30±2,04Bb	6,97±2,12ABa	7,43±1,38Aa	7,53±1,43Aa
	Q_{2.5}	6,43±2,31Ba	7,50±1,28Aa	7,33±1,62Aa	7,50±1,28Aa	7,33±1,42Aa
	Q_{5.0}	6,67±2,32ABa	7,27±1,53Aa	7,17±1,85ABa	7,00±1,51ABa	6,10±2,58Bb
TEXTURA	C	7,60±1,47Aa	6,90±1,81Aa	7,47±1,98Aa	7,63±1,10Aa	6,93±1,99Aa
	Q_{2.5}	6,40±2,44Bb	7,37±1,40Aa	7,60±1,65Aa	7,70±1,34Aa	7,20±1,73ABa
	Q_{5.0}	6,33±2,31Bb	7,40±1,57Aa	7,33±2,04ABa	6,83±1,70ABb	7,03±1,73ABa

^{abc} Médias seguidas de letras iguais na VERTICAL não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

^{ABC} Médias seguidas de letras iguais na HORIZONTAL não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Onde: C= hambúrguer controle, Q_{2.5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Figura 04: Intenção de compra de hambúrgueres com e sem adição de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.



Onde: C= hambúrguer controle, Q_{2.5}= hambúrguer com 2,5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana e Q₅= hambúrguer com 5mg.mL⁻¹ de gel de quitosana.

Tabela 6: Soma das ordens de preferência de hambúrgueres com e sem adição de gel de quitosana armazenados à -18°C por 120 dias.

Tempo de armazenamento (dias)	Controle	Q _{2.5}	Q _{5.0}
0	59a	61a	60a
30	73a	52b	55b
60	64a	57a	59a
90	59b	50b	71a
120	56a	57a	67a

Valores seguidos de uma mesma letra, na horizontal, em formulações diferentes para um mesmo dia de armazenamento, não diferem entre si pelo teste de Friedman ao nível de 5% de probabilidade.

Anexo

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Bioatividade de Quitosana na Inibição de Cepas Patogênicas em Hamburgueres

Pesquisador: MICHELLE GALINDO DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48665815.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.266.304

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado apresentado ao programa de pós graduação em Nutrição/CCS/UFPE. A aluna é profª do CAV e o projeto será desenvolvido no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos Nonete Barbosa Guerra - LEAL e CAV.

Objetivo da Pesquisa:

Principal: Verificar a bioatividade da aplicação de quitosana na inibição de cepas patogênicas em hambúrgueres.

Secundários: - Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da quitosana sobre cepas de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em caldo Muller-Hinton;

- Avaliar a interferência da aplicação da quitosana sobre a *Listeria monocytogenes*

e *Staphylococcus aureus* em hambúrgueres bovino;

- Verificar as alterações nas características de qualidade (análises microbiológicas, físicoquímicas e sensoriais) de hambúrguer bovino adicionado de quitosana;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCO direto para o voluntário: pequeno risco, quanto ao desconforto sensorial. Após a análise, o participante receberá água para aliviar o desconforto, caso haja.

BENEFÍCIOS diretos e indiretos para os voluntários: a quitosana é um produto natural que possui

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

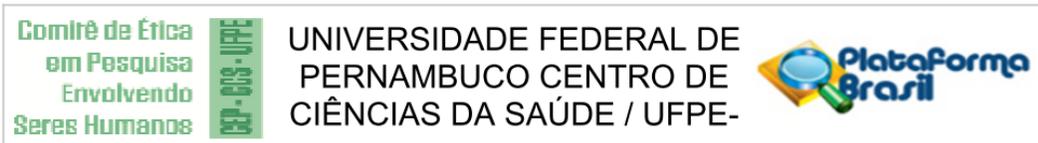
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.266.304

propriedades medicinais para a saúde humana, trazendo assim benefícios para os componentes do painel sensorial. A ANVISA considera a quitosana como um alimento funcional, isto é, alimento que produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto está relacionado com um projeto anterior, aprovado por este comitê (CAAE 0342.0.172.000-08) Registro CEP/CCS/UFPE nº 350/08. Justifica-se essa pesquisa, devido à necessidade de incluir aditivos naturais, em substituição aos conservantes artificiais em alimentos, uma vez que este último pode ocasionar graves problemas à saúde humana. Dessa forma, a aplicabilidade da quitosana na indústria, apresenta uma série de funções desejáveis, uma vez que permite a manutenção da qualidade microbiológica e química, além de que sua produção estimula o efetivo aproveitamento de subprodutos (carapaça de crustáceo), proporcionando um importante impacto social e ambiental.

Todas as etapas da metodologia foram bem descritas. No entanto não consta no projeto atual, onde e como serão recrutados os participantes da pré-seleção de provedores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto e carta de anuência devidamente carimbadas e assinadas; TCLE adequado; Lattes dos pesquisadores anexados e projetos em ambos os formatos adequados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

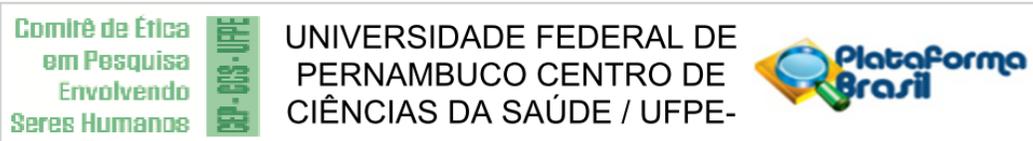
Acrescentar na metodologia dos projetos como e onde serão recrutados os indivíduos de 18 a 65 anos que participarão da pré-seleção de provedores.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está em PENDÊNCIA. O (A) pesquisador (a) deverá atender as considerações do parecer consubstanciado que está anexado - veja "detalhar" - corrigindo as pendências diretamente na Plataforma, no Projeto detalhado e no TCLE, se for o caso. As modificações realizadas devem ser destacadas em amarelo.

É obrigatório anexar à parte, uma carta de RESPOSTA ÀS PENDÊNCIAS, informando onde foram feitas as correções (qual documento/item/página). Siga as instruções do link "Para resolver pendências", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. O (A) pesquisador (a) tem 60 dias para responder aos quesitos formulados pelo CEP em seu parecer. Após esse prazo, o projeto será considerado arquivado (res.466/12).

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.266.304

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_574923.pdf	27/08/2015 18:44:55		Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia.pdf	27/08/2015 18:42:53	MICHELLE GALINDO DE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rostro.pdf	27/08/2015 18:41:49	MICHELLE GALINDO DE	Aceito
Outros	Curriculo_Roberta_de_Albuquerque_Bento.pdf	27/08/2015 17:49:38	MICHELLE GALINDO DE	Aceito
Outros	Curriculo_Thayza_Christina_Montenegro_Stamford.pdf	27/08/2015 17:48:57	MICHELLE GALINDO DE	Aceito
Outros	Curriculo_Michelle_Galindo_de_Oliveira.pdf	27/08/2015 17:45:53	MICHELLE GALINDO DE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Michelle_Galindo.pdf	27/08/2015 17:44:59	MICHELLE GALINDO DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_hamburguer.pdf	20/08/2015 19:11:28	MICHELLE GALINDO DE OLIVEIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 07 de Outubro de 2015

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br