

ÉRICA NASCIF RUFINO VIEIRA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES AÇÚCARES E DE  
*Debaryomyces hansenii*, NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-  
QUÍMICAS E FORMAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS EM  
SALAMES.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de “Magister Scientiae”

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2004

A Deus, por me dar a vida e condições para a realização de mais um grande sonho.  
Aos meus pais, Amélia e Rufino, pelo exemplo de determinação, amor, carinho, apoio e  
confiança.

Ao meu esposo André, pelo amor e por fazer parte desta conquista em todos os  
momentos.

Ao meu irmão Raphael, pela amizade.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e proteção constantes.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus pais, presenças constantes, exemplo valioso de honestidade, perseverança e respeito.

Ao André, meu grande amor, pela presença constante, apoio, carinho e paciência, meu grande companheiro.

Ao meu irmão, conselheiro e amigo de todas as horas.

Ao Wallison, pela alegria constante.

À professora Regina Célia Santos Mendonça, pela orientação, disponibilidade, paciência, amizade e carinho.

À professora Maria Beatriz de Abreu Glória, que permitiu que este trabalho alcançasse dimensões maiores. Obrigada pela orientação, oportunidade e atenção.

Aos professores Lúcio Alberto de Miranda Gomide, Nélio José de Andrade e José Carlos Gomes, pelo auxílio, sugestões e recomendações.

Ao professor Frederico José Viera Passos pela disponibilização do laboratório.

Aos meus amigos e familiares com os quais pude contar sempre.

À Keily, Glauco, Prof. José Antônio, Dane e Ana Célia, pelo auxílio na realização deste trabalho.

A todos funcionários do DTA, em especial: Wandick, Zé Geraldo, Sr. José, Tomaz, Geralda, Vânia, Sr. Luiz, Sr Manoel e Valério, pela ajuda e amizade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ÉRICA NASCIF RUFINO VIEIRA, filha de José Luis dos Santos Rufino e Amélia Maria Nascif Rufino, nasceu em Brasília, Distrito Federal, em 11 de Junho de 1978.

Em março de 1997, ingressou na Universidade Federal de Viçosa – UFV, onde, em maio de 2002, graduou-se em Engenharia de Alimentos.

Em Abril de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se à defesa de tese em Abril de 2004.

## ÍNDICE

LISTA DE QUADROS-----	viii
LISTA DE FIGURAS-----	ix
RESUMO-----	x
ABSTRACT-----	xi
1. INTRODUÇÃO-----	1
2. REVISÃO DE LITERATURA-----	4
2.1. Matéria-prima e insumos usados na elaboração de embutidos-----	5
2.1.1. Carne-----	5
2.1.2. Gordura-----	6
2.1.3. Tripas-----	7
2.1.3.1. Tripas naturais-----	7
2.1.3.2. Tripas artificiais-----	8
2.1.4. Aditivos-----	8
2.1.4.1. Sal e agentes de cura-----	8
2.1.4.2. Carboidratos-----	11
2.1.4.3. Acidulantes-----	13
2.1.4.4. Ácido ascórbico/Ascorbato-----	14
2.1.4.5. Sorbato de potássio-----	14
2.1.4.6. Outros aditivos-----	15
2.2. Fermentação-----	16
2.3. Alterações físicas e químicas durante a manufatura de embutidos fermentados-----	19
2.4. Secagem e Maturação-----	23
2.5. Cultura starter-----	24
2.5.1. Efeitos positivos do uso da cultura starter-----	27
2.6. Leveduras-----	30

2.7. Aminas Bioativas-----	34
3. MATERIAL E MÉTODOS-----	43
3.1. Preparo do inóculo de levedura -----	43
3.2. Preparo do embutido-----	43
3.3. Análises microbiológicas do embutido-----	44
3.4. Análises físico-químicas do embutido -----	45
3.4.1. Perda de Peso-----	45
3.4.2. Determinação do pH-----	45
3.4.3. Determinação da umidade -----	45
3.4.4. Determinação da atividade de água-----	46
3.4.5. Determinação da acidez álcool-solúvel-----	46
3.4.6. Determinação da cor-----	46
3.5. Detecção e quantificação de aminas biogênicas nos embutidos-----	47
3.5.1. Separação e quantificação das aminas -----	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	50
4.1. Análises microbiológicas do embutido-----	50
4.2. Análises físico-químicas do embutido -----	54
4.2.1. Determinação do pH-----	54
4.2.2. Controle do processo de secagem mediante medidas de perda de peso, umidade e atividade de água finais-----	56
4.2.3. Acidez álcool-solúvel-----	59
4.2.4. Características da cor-----	60
4.2.5. Teores de aminas bioativas-----	62
5. CONCLUSÕES-----	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	72
APÊNDICE-----	85

## LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Efetividade dos aditivos na produção de embutidos-----	8
Quadro 2. Principais aminoácidos originados por microrganismos durante a fermentação -----	20
Quadro 3. Possíveis rotas metabólicas de aminoácidos durante a fermentação-----	21
Quadro 4. Desempenho de diversos microrganismos utilizados como starter-----	26
Quadro 5. Ação de culturas starters em embutidos fermentados-----	29
Quadro 6. Teores médios de umidade final dos embutidos elaborados com diferentes açúcares e adicionados ou não de levedura-----	58
Quadro 7. Atividade de água final dos embutidos elaborados com diferentes açúcares e adicionados ou não de levedura-----	59
Quadro 8. Valores finais de acidez titulável para os embutidos elaborados com diferentes açúcares e adicionados ou não de levedura-----	60
Quadro 9. Valores de L*, a*,b*, c e h para os embutidos finais de todos os tratamentos-----	61
Quadro 10. Percentual de redução nos teores de amins bioativas em embutidos quando adicionados de levedura e diferentes açúcares-----	64

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura química de algumas aminas bioativas-----	35
Figura 2. Vias metabólicas para a formação de aminas biogênicas-----	37
Figura 3. Vias biossintéticas de agmatina, putrescina, espermidina e espermina-----	37
Figura 4. Evolução da microbiota bacteriana presente nos embutidos elaborados com diferentes açúcares e adicionados ou não de levedura, durante o processamento-----	50
Figura 5. Evolução da microbiota leveduriforme presente nos embutidos elaborados com diferentes açúcares e adicionados ou não de levedura, durante o processamento-----	52
Figura 6. Comportamento do pH ao longo do processamento nos embutidos elaborados com diferentes açúcares e adicionados ou não de levedura, durante o processamento-----	55
Figura 7. Porcentagem de perda de peso dos embutidos elaborados com diferentes açúcares e adicionados ou não de levedura, durante o processamento-----	57
Figura 8. Teores totais de aminas em mg/ 100 g nos embutidos elaborados com diferentes açúcares e adicionados ou não de levedura-----	63
Figura 9. Teores de aminas nos embutidos elaborados com diferentes açúcares-----	65



## RESUMO

VIEIRA, Érica Nascif Rufino, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2004.  
**Influência de diferentes açúcares e de *Debaryomyces hansenii*, nas características físico-químicas e na formação de aminas bioativas em salames.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Conselheiros: Maria Beatriz de Abreu Glória e Lúcio Alberto de Miranda Gomide.

Avaliou-se o efeito da adição de diferentes tipos de açúcares e da adição de *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* nas características físico-químicas finais do embutido obtido. Foram avaliados seis tratamentos: **G**: 0,5 g de glicose/ 100 g de massa; **S**: 0,25 g sacarose/ 100 g de massa; **L**: 1,0 g de lactose/ 100 g de massa; **GL**: Tratamento **G** com inóculo de levedura; **SL**: Tratamento **S** com inóculo levedura; **LL**: Tratamento **L** com inóculo de levedura. Foram realizadas medidas de pH, porcentagem de perda de peso e contagens bacteriana e leveduriforme durante todo o processamento, análises de acidez titulável, umidade, atividade de água, cor e identificação e quantificação de aminas bioativas nos embutidos prontos. A adição de diferentes açúcares e de *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* não exerceu influência nos parâmetros avaliados, com exceção, da formação de aminas. Pode-se perceber comportamento similar, para todos os parâmetros avaliados ao longo do processamento, em todos os tratamentos avaliados. Todos os embutidos apresentaram ao final do processamento características físico-químicas semelhantes. A formação de aminas biogênicas nos embutidos foi dependente do açúcar utilizado na elaboração do embutido, apresentando maiores teores quando se utilizou sacarose, seguido de lactose e glicose, respectivamente. Com a adição de levedura, pode-se observar que houve redução destes teores para a maioria das aminas, indicando a possibilidade de que a adição de *Debaryomyces hansenii* ao starter láctico seja um mecanismo de controle da formação destas aminas.

## ABSTRACT

VIEIRA, Érica Nascif Rufino, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2004.  
**Influência de diferentes açúcares e de *Debaryomyces hansenii*, nas características físico-químicas e na formação de aminas bioativas em salames.** Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Conselheiros: Maria Beatriz de Abreu Glória e Lúcio Alberto de Miranda Gomide.

Different sugar types and *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* inoculo were included in sausage formulation in order to observe physical-chemical parameters. Were processed six treatments: **G:** 0,5 g glucose/100 g mass; **S:** 0,25 g sucrose/100 g mass **L:** 1,0 g de lactose/100 g mass; **GL:** **G** treatment plus yeast inoculo; **SL:** **S** treatment plus yeast inoculo; **LL:** **L** treatment plus yeast inoculo. In each treatment were evaluated final pH, weight loss, lactic acid bacteria and yeast growing during all processing. Titratable acidity, moisture, water activity, color parameters and identification and quantification of biogenic amines were measured in final products. The results showed that different sugar type addition and yeasts inoculo has not influence in parameters evaluated, exception to biogenic amines production. Similar patterns were observed in all treatment during processing for physical-chemical parameters. Biogenic amines production was sugar type dependent, and high levels were found in sausage elaborated with sucrose, follow by lactose and glucose in that order. Yeast inoculo were important to reduce biogenic amines levels in all treatment and probably that is the most important characteristic for approval their use as meat starter.

## 1. INTRODUÇÃO

Fermentação e secagem são métodos de preservação de alimentos há muitos séculos conhecidos pelo homem. Provavelmente a razão pela qual este tipo de produto se tornou popular na Antigüidade foi a sua estabilidade em climas quentes. O povo não podia explicar porque a carne não se estragava, mas sabia que ela podia ser transportada em mochilas, num camelo ou num burro, e guardada em uma gruta ou em casa por um longo período. Mas se observava que esse alimento possuía um sabor distinto e agradável. Como muitas pessoas produziam este tipo de embutido e adicionavam sua própria carne e condimentos e desenvolveram métodos exclusivos de elaboração, um número muito grande de produtos foi desenvolvido. Tradicionalmente, o conhecimento e a técnica de produção de embutidos fermentados foram mantidos como segredos de família. Hoje, os princípios científicos desta fermentação estão sendo gradualmente conhecidos.

Embutidos fermentados, como salames e similares, são caracterizados por suas propriedades sensoriais, químicas e microbiológicas. Dois fatores básicos tornam estes embutidos diferentes dos outros tipos: o baixo teor de umidade e a presença de ácido láctico, que confere sabor agradável e peculiar ao produto. Isto parece simples, mas, na verdade o processo é complexo e sensível. Embora os diferentes tipos de embutidos fermentados difiram em tamanho, formato, textura e flavor, sua consistência e estabilidade, que são atingidas com o abaixamento do pH e a secagem durante a maturação, dependem da conversão microbiológica de carboidratos em ácido láctico.

A fermentação dos diferentes embutidos cárneos pode ser realizada pela flora natural da carne, constituindo um processo lento, que resulta em um produto com características sensoriais mais suaves, porém com um risco microbiológico maior. Se a fermentação é conduzida mediante o emprego de cultivos iniciadores ou “starters”, se consegue um processo rápido, com uma maior segurança

microbiológica. Todavia nestes produtos, nos últimos anos, se tem observado uma perda sensível na sua qualidade sensorial.

O aroma e o sabor dos embutidos fermentados são, em maior ou menor extensão, qualificados como típicos e derivam dos ingredientes e alterações químicas, que ocorrem durante as etapas de fermentação e secagem. Os diferentes compostos que reconhecidamente têm participação no desenvolvimento do aroma e sabor, podem ser descritos no contexto de quatro processos principais com atuação microbiana – glicólise, proteólise, lipólise e oxidação lipídica.

O primeiro estudo sobre a utilização de cultivos “starters” na produção de embutidos data de 1919, com a utilização de uma cepa de levedura para melhorar o aroma de um embutido. Mais tarde em 1921, foi utilizada uma cepa de *Micrococcus* não patogênico e com capacidade de reduzir o nitrato durante o processamento de produtos cárneos.

É difícil diferenciar com certeza o papel que as bactérias ácido-láticas exercem no desenvolvimento do aroma e sabor dos produtos cárneos, uma vez que se desenvolvem em concomitância com outros tipos de microorganismos, como micrococos e leveduras, ambos com grande capacidade proteolítica e lipolítica.

O papel das leveduras em embutidos cárneos fermentados não é ainda bem conhecido. Apesar disto, *Debaryomyces hansenii*, atualmente é comercializado, em alguns países, como cultura starter para uso na elaboração de embutidos fermentados. As leveduras são naturalmente encontradas no ambiente e na superfície do corpo do animal, podendo passar à carne no momento do abate. A carne *in natura*, por si só, constitui um excelente meio de crescimento. Por outro lado, a alta concentração de sal e a baixa atividade de água, combinadas com o ambiente ácido existente em um embutido fermentado, favorecem o crescimento de certas espécies de leveduras, uma vez que tais condições reprimem o crescimento de bactérias competidoras. Apesar das condições adversas presentes na fase final de elaboração de tais produtos, ainda é possível detectar a presença de leveduras, em nível próximo a  $10^5$  Log UFC/g. Neste contexto, cabe lembrar que a biomassa da célula de levedura é aproximadamente cem vezes maior que a biomassa da célula bacteriana.

Tem sido postulado que as leveduras estabilizam a cor vermelha dos embutidos fermentados e participam melhorando o seu aroma. Acredita-se que impedem a rancidez e protegem o pigmento nitroso-mioglobina por degradarem o peróxido e por consumirem oxigênio, desta forma estabilizando a cor do embutido.

Na fabricação dos produtos cárneos, o “starter” tem que competir com a flora microbiana presente na carne, que por si só pode fermentar o produto. Entretanto, este tipo de processo fermentativo não é adequado, devido à extraordinária variabilidade da carne e da flora microbiana presente na mesma, levando freqüentemente à obtenção de produtos de qualidade muito heterogênea. Neste sentido, a incorporação de um “starter” contribui para se lograr uma segurança na fermentação e uma maior homogeneidade na qualidade do produto.

Extensa bibliografia mostra que o uso dos cultivos “starters” selecionados que cumprem as características metabólicas desejadas garantem a segurança microbiológica do produto, reduzem o tempo de processamento e importam ao produto, consistência, estabilidade e características de qualidade únicas.

Outro aspecto importante que tem sido estudado com maior ênfase nos últimos anos é a formação de amins bioativas em produtos alimentícios em geral, que pode ocasionar diversos efeitos indesejáveis tais como: características sensoriais inadequadas e reações alérgicas, dependendo do tipo de amina e da concentração encontrada.

Aminas bioativas têm sido consideradas em relação à deterioração de alimentos (HALÁSZ *et al.*, 1994). Estas amins podem ocorrer como resultado do crescimento e do metabolismo bacteriano em carnes e são indicadores de extensa contaminação. Podendo ainda, serem formadas como conseqüência de intensa atividade microbiana durante a fermentação, processo básico na produção de salame (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1996).

Estudos reportaram a ocorrência de altos níveis de algumas amins biogênicas em embutidos fermentados vendidos em supermercados (VIDAL-CAROU *et al.*, 1990). A manufatura de embutidos fermentados oferece condições favoráveis ao desenvolvimento e à formação de amins biogênicas, tais como a contagem microbiana elevada e o longo processo de produção permitindo um certo grau de proteólise e finalmente condições de baixa acidez no produto, o que pode favorecer a descarboxilação de aminoácidos (RICE *et al.*, 1976).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a adição de diferentes açúcares: glicose, sacarose e lactose e do inóculo de *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*, em diversas características do embutido, pH, perda de peso, acidez, cor, umidade, atividade de água, contagem bacteriana e leveduriforme e formação de amins bioativas .

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Salames são embutidos cárneos fermentados, curados e secos, elaborados com carne suína e/ou bovina triturada, toucinho picado, adicionados de sal, nitrito ou nitrato, açúcar, especiarias e outros condimentos e aditivos. Apresentam baixo pH, normalmente entre 4,4 e 5,3, são caracterizados pela presença do ácido lático que lhes confere sabor agradável e peculiar, além de baixa atividade de água ( $A_w < 0,92$ ) (BRASIL, 2000).

Como consequência do abaixamento do pH e da secagem, o embutido adquire estabilidade microbiológica, pois a microbiota responsável pela deterioração, em sua maioria, é incapaz de se multiplicar em baixos valores de pH e  $A_w$ .

Também, devido à secagem e abaixamento do pH, o embutido adquire consistência desejável, ao mesmo tempo em que as reações químicas e enzimáticas ocorridas durante a fermentação e maturação permitem a formação do aroma característico.

A denominação específica dos salames é consequência, principalmente: do processamento adotado (com ou sem defumação); do grau de moagem; do tipo de carne utilizada na formulação; da tripa (calibre, origem) em que são embutidos; da condimentação; e do grau de secagem: seco, semi-seco; entre outros.

No Brasil, a definição, classificação, composição e demais características de identidade e qualidade de embutidos fermentados é regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução normativa nº 22, de 31 de Julho de 2000, Anexo V (Apêndice 1).

## 2.1 – Matéria-prima e insumos usados na elaboração de embutidos.

### 2.1.1 – Carne

A mistura inicial utilizada na manufatura do embutido deve conter no mínimo 60 g por 100 g de carne, com exceção do salame tipo Hamburguês que deve conter 50 g por 100 g (Apêndice 1). Qualquer espécie de carne utilizada deve ter boa qualidade e estar livre de manchas que indiquem contaminação, deterioração e condições inadequadas de manejo e abate, que podem acarretar a desqualificação da carne, pela alteração do pH, coloração e texturas (relacionada à capacidade de retenção de água), incompatíveis com a qualidade do produto (DIESTRE, 1990). Desta forma, os cuidados na elaboração de um embutido devem começar com a obtenção, escolha e tratamento da matéria-prima (TERRA, 2000).

A carne deve apresentar boa qualidade microbiológica, para reduzir a competição da microbiota autóctona com a cultura starter no início da fermentação (VARNAM e SUTHERLAND, 1995; KROCKEL, 1995).

A alimentação e manejo dos animais influenciam a qualidade da carne destinada à produção do embutido, sendo recomendado o uso da carne de animais adultos, uma vez que a carne de animais mais jovens é mais pálida, resultando em produtos de cor menos intensa, indesejáveis (FREY, 1983).

Durante o abate e preparo, a carne pode estar contaminada por diversos tipos de microrganismos presentes no ambiente, incluindo bactérias lácticas ou não. Diversos microrganismos são capazes de crescer na carne, em virtude de sua natureza altamente nutritiva, da atividade de água da carne próxima a 0,99 e pH em torno de 7,0, fatores estes que coincidem com as condições ótimas para o crescimento microbiano (KROCKEL 1995).

Dois grupos de bactérias são comumente desejáveis durante a fermentação da carne, bactérias lácticas e Micrococcaceae. Algumas bactérias encontradas são usualmente relatadas como deterioradoras, patogênicas ou indesejáveis; dentre elas: Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria* e *Clostridium* (KROCKEL 1995).

Carnes DFD (escura, firme e seca), com pH em torno de 6,2, tornam mais propício o crescimento de microrganismos indesejáveis, podendo suprimir o desenvolvimento da microbiota desejável e aumentar a ocorrência de defeitos no embutido (FREY, 1983). Por outro lado, a carne DFD é ainda inadequada para a

elaboração de salames, tendo em vista sua característica de grande capacidade de retenção de água (GREER e MURRAY, 1988; TERRA, 2000). Como consequência de seu uso podem ter lugar os seguintes defeitos: embutido de coloração pálida, má conservação da cor, consistência deficiente, acidificação excessiva ou insuficiente, e até mesmo a completa alteração das características do produto.

A carne PSE (pálida, macia e exudativa), com pH em torno de 5,8, pode ser utilizada em até 30% da mistura inicial. Quando utilizada em concentrações maiores, pode haver maior perda de peso no embutido e conseqüentemente menor rendimento (GREER e MURRAY, 1988; TERRA, 2000).

Recomenda-se salgar a carne antes do uso, para favorecer a perda de certa quantidade de água. Uma baixa atividade de água inicial desfavorece o desenvolvimento de grande número de microrganismos e contribui para obtenção de um embutido de qualidade. Este artifício, também permite que a maturação e secagem sejam aceleradas, pois parte da água é previamente eliminada.

### **2.1.2 - Gordura**

A gordura é um ingrediente importante e pode corresponder a mais de 50% do peso do embutido após a secagem. A oxidação da gordura provoca a rancificação do embutido e reduz sua vida-de-prateleira. Portanto, é importante utilizar gordura com alto ponto de fusão e na qual haja baixa concentração de ácidos graxos insaturados. A gordura traseira (região costo-lombar) do suíno é largamente utilizada, uma vez que o conteúdo de ácido linoléico polinsaturado é baixo, tornando-a menos propensa à oxidação. As gorduras da região ventral são mais macias, mas possuem ponto de fusão mais baixo, sendo mais susceptíveis ao ranço, por possuírem maior quantidade de ácidos graxos insaturados livres. Tecidos contendo pouca gordura, provenientes de suínos alimentados com dieta rica em ácidos graxos polinsaturados podem causar defeitos na cor e no flavor e sofrer rápida oxidação (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

A gordura a ser utilizada não deve ser submetida ao armazenamento, pois nesta etapa podem ocorrer reações oxidativas e desenvolvimento da rancidez. Preferencialmente deve ser utilizado gordura fresca (FREY, 1983).

Embora a fermentação não seja influenciada pela qualidade da gordura adicionada, a utilização de gordura velha ou rançosa pode ocasionar defeitos na cor e flavor dos embutidos (KROCKEL, 1995).



Deve-se ainda considerar que o toucinho tem pH superior ao da carne magra, portanto a proporção de sua adição deve ser bem estabelecida. O mesmo deve ser observado em formulações nas quais haja a adição de aparas e outras porções de tecido conjuntivo (FREY, 1983; STIEBING e RODEL, 1988; VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

### **2.1.3 - Tripas**

O material utilizado como envoltório para a massa do embutido é de grande importância. As tripas podem ser naturais, provenientes do trato digestivo de suínos, bovinos e ovinos, ou artificiais, de colágeno ou fibras de celulose.

Observa-se um crescimento no uso de tripas artificiais, por apresentarem uniformidade e maquinabilidade desejáveis.

#### **2.1.3.1 - Tripas naturais**

Deve-se dar especial atenção à preparação e armazenamento da tripa natural. A limpeza cuidadosa e a eliminação da mucosa intestinal são operações importantes. Se a retirada da mucosa for incorreta, ocorrem alterações na perda de água do embutido e formação de uma camada ressecada (crosta) nos pontos sem gordura, ambos efeitos indesejáveis. As tripas limpas devem ser armazenadas secas, bem salgadas e sob refrigeração, com o objetivo de evitar a atividade bacteriana. As tripas mal acondicionadas arrebentam durante as etapas de embutimento ou maturação, e aquelas com alta contagem microbiana provocam alteração da cor e consistência em toda peça (FREY, 1983).

No momento de embutir, as tripas devem ser colocadas por 30 minutos em água aquecida para que os cristais de sal sejam dissolvidos e os tecidos hidratados. Esse procedimento facilita o embutimento e moldagem da massa no envoltório, após o recheio (ODA *et al.*, 2003).

Algumas alterações de caráter bioquímico e microbiológico podem prejudicar o desempenho de uma tripa natural em sua função de acondicionar um determinado produto cárneo. A putrefação ocorre pela ação de microrganismos esporogênicos oriundos do próprio trato intestinal do animal abatido e manifesta-se quando as tripas são deixadas em ambientes com temperatura elevada ou em água morna por períodos prolongados (PARDI *et al.*, 1995).

As tripas devem ser bem selecionadas, pois algumas apresentam grânulos que conferem aspecto desagradável ao embutido. Em especial, não se deve utilizar tripas rançosas ou velhas, que podem promover a rancificação do embutido e alteração da cor (ODA *et al.*, 2003).

### 2.1.3.2 - Tripas artificiais

As tripas artificiais são mais práticas e seguras para armazenar; apresentam perdas escassas, aspecto atrativo e uniformidade de calibre ao produto final.

Entre outras características, pode-se citar a permeabilidade à fumaça, possibilidade de armazenamento à temperatura ambiente sem que ocorra deterioração, ausência de untuosidade superficial, firmeza ao embutir e possibilidade de impressão de propagandas. Porém, têm as desvantagens de não serem comestíveis e darem aspecto artificial ao produto (ODA *et al.*, 2003).

### 2.1.4 - Aditivos

Diversos aditivos podem ser utilizados na formulação de embutidos, como indicado no Quadro 1.

**Quadro 1-** Efetividade dos aditivos na produção de embutidos

Aditivos	Parâmetros						
	Cor	Estabilidade da cor	Textura	Habilidade de corte	Sabor	Aroma	Conservação
<b>NaCl</b>			++	+	++		+
<b>NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub></b>	++	++			+		+
<b>GDL</b>	+	+	+	++			+
<b>Açúcares</b>	+	+	+	++	+	++	+
<b>Ácido ascórbico</b>	++	++					+
<b>Starter</b>	++	++	++	++	++	++	++

(+ Pouca influência, ++Grande influência).

Fonte: VARNAM e SUTHERLAND (1995).

#### 2.1.4.1 – Sal e agentes de cura

Nos embutidos fermentados o cloreto de sódio (NaCl) desempenha papel importante no sabor, na preservação e na obtenção da textura desejada. Geralmente, utiliza-se de 2 a 3% de NaCl nas misturas de embutidos crus, de modo a reduzir a atividade de água (Aw), inibindo ou retardando o crescimento de vários microrganismos indesejáveis, como pseudomonas e enterobactérias, e favorecendo o

desenvolvimento de lactobacilos e micrococos. Concentrações acima de 3% podem prolongar o tempo de fermentação, dificultando a ação das bactérias lácticas, que requereriam maior tempo para fermentar e reduzir o pH. *S. aureus*, um dos principais patógenos em produtos cárneos fermentados, é mais halotolerante que bactérias lácticas, de modo que uma formulação que contenha 4% de sal poderá favorecer seu crescimento (BACUS, 1984; KRAFT, 1986; STIEBING e RODEL, 1988).

Os principais efeitos do NaCl sob os microrganismos são: aumento da pressão osmótica, que leva à plasmólise; decréscimo da atividade de água; produção de íons Cl, que são tóxicos; redução da solubilidade do oxigênio; aumento da sensibilidade da célula ao dióxido de carbono e interferência na ação de enzimas proteolíticas. Cátions podem também saturar a parede celular bacteriana carregada negativamente mudando sua condutividade, causando assim desordens metabólicas celulares, que podem levar à morte do microrganismo (RACCACH e HENNINGSEN, 1997).

KATSARAS e BUDRAS (1992) mostraram a interdependência existente entre a configuração da matriz protéica, a concentração de sal e o crescimento dos microrganismos responsáveis pela fermentação.

O sal desempenha um importante papel na solubilização de proteínas, que formam um filme viscoso ao redor de partículas individuais de carne, enquanto o nitrito é importante na coloração da carne fermentada e retardamento da oxidação de lipídeos (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

O nitrato auxilia na preservação da cor vermelha da carne e direciona o processo de cura. Sob baixa concentração de oxigênio, ou em anaerobiose, o nitrato é reduzido a nitrito. Este é utilizado pelos microrganismos como acceptor de elétrons e durante esse processo, ocorre ganho de energia (AL-JALAY *et al.*, 1987; MEISEL, 1988).

A redução de nitrato a nitrito é atribuída a microrganismos do gênero *Micrococcus* e *Staphylococcus* (PUOLANNE, 1977; BACUS, 1984; HAMMES *et al.*, 1990; KROCKEL, 1995), tais como *S. xylosum*, *S. carnosus*, *S. simulans*, *S. sciuri* e *Micrococcus varians* (SCHLEIFER, 1986).

O nitrito é importante na conservação das carnes, podendo agir tanto como agente redutor como oxidante. O ácido nitroso, originário da ionização do nitrito em ambiente ácido, decompõe-se em óxido nítrico (NO), responsável pela fixação da

cor em produtos curados. O óxido nítrico pode também reagir com outros compostos como catalase, peroxidase, citocromos, podendo ter efeito antimicrobiano sobre microrganismos aeróbios. O estado não dissociado máximo e, portanto, a maior atividade antimicrobiana do ácido nitroso ocorre quando o pH está entre 4,5 e 5,5. *Clostridium botulinum* é o microrganismo que apresenta maior inibição por nitrito, mas outros microrganismos também são afetados. O mecanismo de ação do nitrito em microrganismos está relacionado com a inativação de enzimas envolvidas no metabolismo respiratório e conseqüente interferência na produção de ATP, além de se combinar com várias enzimas ferrossulfuradas, inibindo outros processos metabólicos na célula, tais como: captação de substrato para síntese de macromoléculas e captação e metabolismo de glicose (RAMARATHNAM *et al.*, 1991; JAY, 1992; SANZ *et al.*, 1998).

A quantidade total de nitrato e nitrito adicionada aos embutidos pode variar consideravelmente entre 20 e 200 ppm (partes por milhão) (ARNETH e HEROLD, 1988). Teores típicos de nitrito na cura de carnes estão entre 100 – 200 ppm, embora 30 – 50 ppm sejam suficientes para obtenção da cor desejada (WIRTH, 1991).

Quantidades de nitrito entre 120 e 150 ppm são efetivas contra o crescimento microbiano indesejável, quando combinadas a outras barreiras tais como, redução da  $A_w$  e pH. Em embutidos com  $A_w$  entre 0,96 – 0,97, a flora Gram negativa é mais afetada pela redução de  $A_w$ , e ainda, essa redução favorece o crescimento de *Micrococcaceae* e bactérias lácticas (KROCKEL, 1995).

Levando-se em consideração aspectos toxicológicos, a utilização de nitrito é preferível à utilização de nitrato. Um teor inicial de 100 ppm de nitrito é reduzido a 10 -20 ppm após 10 dias de fermentação e a menos de 10 ppm após 30 dias de maturação (WIRTH, 1991).

Segundo BACUS (1984), os sais de cura e as etapas do processamento criam uma microbiota diferente na carne, favorecendo o crescimento de bactérias específicas, facultativas e Gram positivas, enquanto inibem o crescimento de microrganismos deterioradores, aeróbios e Gram negativos, normalmente encontrados na carne fresca.

Em algumas misturas tradicionais de embutidos fermentados, como “chorizos” espanhóis, não se adiciona nem nitrato, nem nitrito. Pequenas quantidades de nitrato são derivadas de outros ingredientes, incluindo alho e páprica.

Nitrito é importante no início da fermentação, principalmente porque as outras condições restritivas ao crescimento microbiano indesejável ainda não foram alcançadas. Ao mesmo tempo, atua na inibição de *Salmonella*, que pode estar presente na mistura inicial do embutido (LEISTNER, 1981).

Nitrato pode ser adicionado puro ou em combinação com nitrito, sendo, portanto necessário incluir microrganismos nitrato redutase na cultura starter para garantir a presença de quantidade suficiente de nitrito (PIERSON e SMOOTH, 1987; VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

Quando se utiliza nitrato e a redução do pH ocorre com excessiva rapidez nos primeiros dias, seja por adição de glucona-delta-lactona, altos teores de açúcar ou por utilização de altas temperaturas, pode-se ter uma redução insuficiente de nitrato a nitrito, o que acarreta avermelhamento deficiente e manchas no embutido.

Quando se utiliza nitrito as reações de formação da cor são principalmente de natureza química e, para que estas continuem ocorrendo, é desejável um pH mais baixo. Desta forma, aumenta-se a velocidade das reações de redução e consegue-se um melhor avermelhamento e estabilização da cor (FREY, 1983).

PUOLANNE (1977), estudando o efeito da redução de nitrato a nitrito nas propriedades finais do embutido, concluiu que quando há adição de níveis superiores a 100 ppm de nitrato e 125 ppm de nitrito, a microbiota láctica adicionada tem seu crescimento retardado. Porém, se essas concentrações forem reduzidas à metade esse crescimento é promovido e ocorre decréscimo adequado no pH. O crescimento de *Micrococcus* não foi afetado pela adição dos sais de cura, sendo possível obter a cor desejada com adição de 25 ppm de nitrito e 50 ppm de nitrato.

#### **2.1.4.2 - Carboidratos**

Os carboidratos estão presentes na carne, em pequenas quantidades. Por isso, sua adição como ingrediente na formulação de embutidos é uma prática comum. O principal propósito de sua utilização é assegurar a presença de substrato fermentescível suficiente para favorecer o desenvolvimento de bactérias lácticas e a produção de ácidos. São utilizados ainda para compensar o efeito desidratante e retirar o amargor provocado pelo sal. Conseqüentemente é seguro supor que o tipo e a quantidade de açúcares são também de fundamental importância na qualidade do alimento, tendo seu efeito tanto na fase aquosa quanto protéica (REIS *et al.*, 1998; SEMENOVA *et al.*, 2002).

Os açúcares adicionados à formulação dos embutidos se diferenciam por sua composição química, pela forma de ação e pela maneira que são metabolizados pelos microrganismos. As bactérias lácticas podem fermentar diversos tipos de açúcares, sendo que a velocidade de fermentação e a quantidade de ácido formada variam de acordo com o tipo de açúcar e flora microbiana presente (JAY, 1992).

A quantidade e o tipo de carboidrato adicionado deve manter um balanço entre a necessidade de estabilizar efetivamente a fermentação láctica e a necessidade de evitar um decréscimo muito rápido do pH. Os ácidos formados na degradação dos carboidratos são fundamentais para a maturação dos embutidos, cujo processo pode vir a ser controlado a partir dos açúcares (TAKAHASHI, 1980). A adição de carboidratos é feita em níveis entre 0,4 - 0,8 g por 100 g (LEISTNER, 1995; TERRA, 2003).

Com adição de glicose se percebe uma maior e mais rápida formação de ácido. O que se pode perceber, de forma geral, é que açúcares com estrutura química simples (monossacarídeos) são fermentados mais rapidamente, quando comparados a açúcares com estrutura complexa (polissacarídeos). Neste caso, percebe-se também que a quantidade de ácido formada é maior para glicose. A concentração de glicose recomendada está na faixa de 0,3 - 0,5 g por 100 g. Juntamente com a glicose podem ser adicionados outros açúcares, que funcionarão como fonte extra de carboidratos; entre eles: lactose, sacarose e produtos açucarados compostos por mono, di e polissacarídeos (NYNCHAS *et al.*, 1988; HA-LA BIOTEC, 1991; LEISTNER, 1995).

É relevante considerar que o pH final do embutido pode ser determinado pela quantidade de açúcar adicionado à massa, pois quanto maior essa quantidade, maior a produção de ácido e, conseqüentemente, menor o pH final do produto (HA-LA BIOTEC, 1991). Porém, a adição de carboidratos em concentrações superiores a 2 g por 100 g pode reduzir a taxa de fermentação, através da sua ligação com a água disponível, promovendo redução no valor de  $A_w$  (TERRA, 2003).

Na produção do embutido, deve-se considerar, além do açúcar utilizado, a cultura starter adicionada à massa. Para culturas contendo *Lactobacillus*, um aumento na concentração de açúcar ocasiona uma fermentação mais rápida e um pH final mais baixo. Para culturas contendo *Pediococcus*, a concentração de açúcar utilizada pouco interfere, pois este microrganismo apresenta baixa tolerância a sal e à medida que o embutido vai desidratando, ocorre aumento da concentração salina,

que ocasiona queda no metabolismo deste microrganismo, retardando o processo fermentativo (HA-LA BIOTEC, 1991).

Na elaboração dos diferentes salames, a lactose vem sendo utilizada com muita ênfase, face a seu lento desdobramento e a conseqüente suavidade do pH final do embutido, tendo ainda como características desejáveis o preço mais baixo e o sabor menos adocicado (HOLLEY *et al.*, 1988; TERRA, 2003). A concentração de lactose comumente utilizada está entre 0,5 e 1,0% (LEISTNER, 1995).

#### **2.1.4.3 - Acidulantes**

São adicionados para assegurar uma rápida redução do pH nos estágios iniciais da fermentação. O uso de acidulantes é considerado essencial para garantir a segurança de embutidos fermentados manufaturados sem a adição de cultura starter.

Normalmente este rápido abaixamento do pH pode ser obtido pela adição de glucona delta lactona (GDL), um anidrido interno do ácido glucônico, derivada da glicose. Sob ação da água contida na carne ou na massa, a GDL se hidrolisa em ácido glucônico, ocasionando o abaixamento no pH. Esta reação é dependente da quantidade de GDL adicionada e da temperatura. Normalmente é adicionada em níveis de 0,5% a 0,8%. Porém, interfere na redução de nitrato e na formação de aroma em embutidos fermentados secos, não sendo, portanto, utilizada na manufatura destes. A adição de GDL em concentrações acima de 1,0% apresenta grandes chances de desenvolvimento da rancidez e de lactobacillus produtores de peróxido, devendo-se evitar também o uso de temperaturas de maturação muito altas, o que leva a um aumento na velocidade das reações (FREY, 1983).

A acidificação direta pela adição de ácido láctico ou outros ácidos orgânicos, é utilizada na manufatura de alguns tipos de embutidos. Neste caso, a consistência da mistura é modificada devido à coagulação das proteínas da carne, dificultando o processo de embutimento. Este problema pode ser superado pelo encapsulamento de ácidos orgânicos, da mesma forma que a GDL, em uma capa de óleo vegetal parcialmente hidrogenado. Esta cápsula é formulada para fundir e liberar o ácido quando houver aumento da temperatura após o embutimento. A liberação do ácido a temperatura ambiente é comum, porém, em alguns casos, a capa não funde antes que sejam atingidas temperaturas de secagem entre 60 e 65°C (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

Como consequência do decréscimo relativamente rápido do pH ao ponto isoelétrico, a carne perde grande quantidade de água e há rápida perda de peso na fase de secagem, nos primeiros dias da maturação.

#### **2.1.4.4 - Ácido ascórbico/ Ascorbato**

O ácido ascórbico e o ascorbato são substâncias redutoras relativamente fortes e têm importância decisiva na obtenção de um embutido de cor desejável e estável microbiologicamente. A obtenção da cor é decorrência de diversas reações, entre elas a redução de nitrito a óxido nitroso, que pode ser influenciada positivamente pela adição de substâncias redutoras. O ácido ascórbico perde sua ação no transcurso desta reação. porém, a pigmentação já foi concluída. Sua reação com o nitrito é espontânea, enquanto o ascorbato tem papel menos intenso, sendo, portanto preferível à utilização do primeiro para garantia da obtenção da cor. Quando quantidades excessivas são agregadas, a conservação da cor pode ser deficiente, especialmente quando se efetua o emprego concomitante com outras substâncias redutoras (Ex: glicose). Este defeito pode ser agravado em decorrência de um decréscimo muito acentuado do potencial redox (FORREST, 1995).

Quando se utilizam preparados que contenham ácido ascórbico, não se deve misturá-los ao sal de cura, pois podem ocorrer reações espontâneas destes compostos, o que leva a uma menor disponibilidade do nitrito como substância de cura e, conseqüentemente, prejudica a formação da cor. Devem ser armazenados em local fresco e seco, impedindo, assim, a oxidação do ácido e o aparecimento de manchas escuras nestes aditivos (FREY, 1983).

#### **2.1.4.5 - Sorbato de potássio**

Como consequência da alta umidade do ambiente e da superfície do embutido, fungos e bactérias indesejáveis podem se multiplicar com facilidade. Como consequência, podem ocorrer defeitos de cor nas camadas periféricas dos embutidos, sendo que estas alterações podem estender-se a toda peça. A cor cinza, ou a aparição de zonas negras, na superfície ou embaixo da tripa é consequência de uma intensa contaminação superficial. Quando se empregam tripas de celulose, estas podem estalar ou rasgar, já que muitos microrganismos são capazes de desdobrar a celulose.



O uso de sorbato de potássio é uma maneira viável de se evitar a contaminação superficial. Os embutidos, no 2º dia de maturação, podem ser submergidos rapidamente, em uma solução com concentração de 10 a 20 g por 100 g de sorbato. Com isto se evita de maneira efetiva o crescimento de microrganismos indesejáveis. Tal prática é particularmente importante para embutidos secos ao ar, sem defumação. Porém, quando se submergem embutidos elaborados com NaCl e nitrato, se produz uma coloração esverdeada na superfície, já que os microrganismos necessários ao processo de formação da cor, redutores de nitrato, também são inibidos ou eliminados (LAWRIE, 1995).

Também, durante o armazenamento dos embutidos, depois de terminada a maturação, podem aparecer mofo superficiais. Para evitá-los, pode-se defumar as peças no 3º ou 4º dia de maturação; assim, os componentes bactericidas da fumaça impedem a formação deste revestimento superficial.

#### **2.1.4.6 - Outros aditivos**

Os condimentos são empregados com fins determinados e também para melhorar as características sensoriais dos embutidos. É essencial dosar adequadamente e escolher acertadamente os condimentos usados, pois se deve evitar que o sabor de um determinado condimento fique excessivamente realçado ou que o embutido perca seu sabor de curado (LUCKE, 1986).

Em algumas classes de embutidos crus deve prevalecer um aroma típico especial. Nestes casos, são suficientes, um leve toque de pimenta, com ligeira adição de outros componentes. Outros embutidos crus, como os húngaros, franceses ou italianos, exigem a adição de diferentes quantidades de alho. O gengibre e o rum também são condimentos muito utilizados na formulação de embutidos.

Estudos têm descrito as propriedades inibitórias de condimentos como cebola, alho, cravo, canela, orégano e alecrim, dentre outros, sobre a microbiota de carnes e derivados. Os condimentos afetam as fases de crescimento microbiano: a fase lag é prolongada e durante fase log ocorre uma redução na taxa de crescimento. Em alimentos processados sob boas condições sanitárias e contendo reduzido número de populações microbianas, o efeito antimicrobiano dos condimentos pode ser mais efetivo, fornecendo uma proteção contra fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas (SHELEF *et al.*, 1980; DÍAZ *et al.*, 2002).

Os condimentos tipicamente utilizados na formulação de embutidos apresentam efeitos diretos na taxa de fermentação, estimulando a produção de ácidos pelas bactérias. Os condimentos agem como ativadores do metabolismo das bactérias lácticas, o que se deve, provavelmente, à presença do íon manganês. Esta rápida produção de ácido nos primeiros estágios da fermentação é desejável porque controla o crescimento de microrganismos patogênicos que podem estar presentes no produto (ZAIKA e KISSINGER, 1984).

A indústria oferece diversas opções de especiarias e extratos, o que permite a cada fabricante condimentar seu produto com segurança e uniformidade. A maioria das indústrias oferece produtos com baixas contagens ou ausência microbiana, o que exclui praticamente a ocorrência de maturações anormais ou a proliferação de uma microbiota indesejável como consequência da adição dos mesmos.

Outros aditivos encontrados na formulação de embutidos fermentados exercem efeitos diferentes na fermentação. O significado prático atribuído a cada componente é dependente da concentração, atividade da cultura e das demais condições de processamento. Geralmente, fumaça líquida (defumação) e antioxidantes retardam a fermentação. Os fosfatos funcionam como tampões e aumentam a fase lag dos microrganismos antes do decréscimo do pH. A adição de leite em pó e proteína de soja podem reduzir a taxa de fermentação das bactérias lácticas, por se ligarem à água disponível (MENDONÇA, 1992).

## **2 - Fermentação**

De forma geral, a fermentação pode ser considerada um estágio no qual a atividade metabólica (oxidação anaeróbica incompleta) e crescimento de bactérias lácticas (metabolismo aeróbico) ocorrem de forma muito expressiva, continuando em taxas reduzidas durante a maturação e secagem de embutidos fermentados. No caso de embutidos fermentados secos, a taxa de metabolismo bacteriano é reduzida ao longo da secagem, embora a atividade de enzimas microbianas persista, mesmo que as condições não permitam o crescimento (VARNAM e SUTHERLAND, 1995; KROCKEL, 1995; LAWRIE, 1995).

As principais transformações que ocorrem na fase de fermentação podem ser resumidas em: mudanças na microbiota inicial, redução de pH, redução de nitrato a nitritos e deste à óxido nítrico, formação de nitrosomioglobina, solubilização e gelificação de proteínas e fenômenos de oxidação e desidratação. Assim, inibe-se o

crescimento de microrganismos indesejáveis e melhora-se a qualidade do produto final, para maior conservação e segurança do produto (LIZASCO *et al.*, 1999).

Os principais objetivos da fermentação, em produtos cárneos, são a formação de sabor característico, desenvolvimento da firmeza e fatiabilidade, além da inibição de bactérias deterioradoras e patogênicas. Esses objetivos podem ser alcançados por meio de uma interação microbiológica complexa, reações químicas e fatores físicos (HAMMES *et al.*, 1990).

Durante a fermentação, a seleção de condições favoráveis ao desenvolvimento e crescimento da microbiota desejada, é particularmente importante, pois a carne não sofrerá cozimento antes ou depois da fermentação.

A estabilidade microbiana atingida na fermentação ocorre em virtude da quebra anaeróbica de carboidratos e conseqüente formação de álcoois e ácidos: fórmico, acético, propiônico ou láctico, por ação de microrganismos não patogênicos. Estes microrganismos e o ambiente inibem o crescimento da microbiota bacteriana indesejável, o que tornaria o alimento tóxico ou inaceitável (LAWRIE, 1995).

A produção de ácidos, principalmente do ácido láctico, é conseqüência do metabolismo microbiano, principalmente de bactérias lácticas adicionadas no início do processamento. A produção de ácidos tem efeito antimicrobiano; porém, o principal efeito desejado é a redução do pH, para a ocorrência de diversas alterações químicas e microbiológicas que vão conferir ao embutido as propriedades sensoriais desejadas, entre elas o sabor picante proporcionado pelo próprio ácido láctico.

Estes ácidos difundem livremente através da membrana celular de microrganismos e, posteriormente, se ionizam dentro das células, acidificando o meio interno e inibindo o seu crescimento. Somente os ácidos orgânicos que são lipofílicos têm atividade antimicrobiana. Eles inibem as atividades dos microrganismos por interferirem na permeabilidade da membrana celular, levando à inibição do transporte de substrato e a fosforilação oxidativa a partir do sistema de transporte de elétrons. O ácido acético, produzido em pequenas quantidades, tem poder bactericida maior do que o ácido láctico. Portanto, os ácidos orgânicos têm pouco efeito direto na estabilidade microbiológica de embutidos secos, uma vez que, se encontram na forma dissociada, sendo mais efetivos na redução do pH (BAIRD-PARKER, 1980).

As bactérias lácticas podem fermentar diversos tipos de açúcares, sendo que a velocidade de fermentação e a quantidade de ácido formado variam de acordo com o tipo de açúcar e microbiota presente (HA-LA BIOTEC, 1991).

A fermentação, mesmo sendo um importante método de conservação da carne, é raramente utilizada sozinha. A conservação é atingida mediante a combinação da fermentação com outros fatores, entre eles, a redução da atividade de água por secagem e a adição de sal.

A temperatura de fermentação varia de acordo com o tipo de embutido (LUCKE, 1998). Geralmente, altas temperaturas (32°C) são utilizadas quando um rápido decréscimo do pH é desejável; porém, podem ocasionar problemas tecnológicos em relação à segurança do produto. A acidificação rápida proporciona ao embutido aroma e sabor fortes e a alta temperatura pode causar fusão da gordura no produto. Porém, o principal problema seria o favorecimento do crescimento e a produção de toxina por *S.aureus*, nestas condições (BACUS, 1986). Temperaturas baixas de fermentação (10°C) têm efeito positivo no desenvolvimento da cor e do flavor (JESSEN, 1995).

Na prática comercial, a temperatura e o tempo de fermentação podem variar consideravelmente. Geralmente, para embutidos fermentados secos utiliza-se entre 18 - 26°C por 24 - 72 horas, dependendo do diâmetro do embutido (HOLLEY, 1981; BACUS, 1986).

A extensão da acidificação varia de acordo com o produto, mas os valores mais encontrados em termos de pH e que se apresentam melhores são: aproximadamente 5,0 para embutidos secos e entre 5,0 - 5,5 para embutidos semi-secos. A presença de ingredientes em minoria pode afetar a extensão da acidificação. Antioxidantes, como BHT, reduzem a queda de pH, apesar de poderem inibir a atividade de *Listeria monocytogenes* e de outros patógenos. A produção de ácido é melhor em salames embalados a vácuo e em salames de maior diâmetro, onde o oxigênio é limitado. A produção de amônia, todavia, é acentuada em embutidos de maior diâmetro e compensa a queda de pH causada pela produção de ácido láctico (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

O código australiano de práticas de manufatura (1982) exige que, para embutidos secos e semi-secos, ocorra queda do pH a 5,2 nas primeiras 48 horas de fermentação, com temperatura abaixo de 25°C. No mesmo ano, o Instituto Americano de Carnes e outros órgãos recomendaram que o pH atingido durante a

fermentação fosse menor que 5,3, com tempo determinado pela temperatura utilizada, como por exemplo, 80 horas a 24°C ou 18 horas a 43°C (BACUS, 1984).

### **2.3 - Alterações Físicas e Químicas durante a Manufatura de Embutidos Fermentados**

A fermentação de carboidratos começa assim que os ingredientes são misturados. Como regra geral, 50% da glicose é metabolizada durante a fermentação ativa e 74% deste valor é utilizado para formação de ácidos orgânicos, sendo o ácido láctico predominante. Porém, ácido acético em quantidades traço e intermediários do ácido pirúvico também estão presentes. Aproximadamente 18% da glicose adicionada, é fermentada durante a secagem, dos quais 83% são convertidos em ácido láctico. Além da temperatura, a produção de ácido láctico é afetada por diversos outros fatores, incluindo a composição da microbiota e a concentração de oxigênio. A completa oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> e água é favorecida por altas concentrações de oxigênio (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

A queda no valor do pH é acompanhada pela coagulação das proteínas solúveis da carne, redução da capacidade de retenção de água e secagem (LUCKE, 2000). Este efeito é aumentado por altos níveis de NaCl. Proteínas miofibrilares exibem o melhor decréscimo na solubilidade em baixos valores de pH e são, provavelmente, de maior importância na determinação da consistência quando comparadas às proteínas sarcoplasmáticas. Parece provável, todavia, que ocorram interações quando há indução por NaCl na solubilização de proteínas sarcoplasmáticas, afetando a precipitação de proteínas miofibrilares e aumentando a formação de gel estruturado (GARCÍA e FOX, 1991).

Bactérias lácticas são pouco proteolíticas em comparação a outros microrganismos, tais como, *Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas* e coliformes (NAES *et al.*, 1991). A importância da proteólise durante a maturação do embutido fermentado está na obtenção da estabilidade adequada. Sua extensão varia de acordo com diversos fatores, incluindo a natureza da microbiota endógena da carne e as condições de processamento. Mudanças no conteúdo total das proteínas envolvem tipicamente, um decréscimo entre 20 – 40%, em 14 – 15 dias de maturação, enquanto um aumento de até 30% no conteúdo de compostos nitrogenados não protéicos em embutidos fermentados secos é relatado em embutidos com maturação de 100 dias (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

Como consequência da proteólise ocorrida durante o processo de cura em embutidos fermentados ocorre aumento de nitrogênio não protéico e aminoácidos livres. O aumento dos aminoácidos livres e produtos de sua degradação e o aumento dos compostos nitrogenados de baixo peso molecular, como a carnosina, que é um dos constituintes do componente gustativo, podem contribuir para a formação do sabor (LUCKE, 1985; DEMASI, 1990).

DEMEYER (1995), estudando diferentes culturas starters e sua capacidade para a geração de compostos voláteis a partir de aminoácidos, encontrou que 70% da metabolização de peptídeos e aminoácidos (Quadro 2) é devido à atividade enzimática microbiana. Portanto, a atividade proteolítica que libera pequenos peptídeos e aminoácidos é desejável em um starter, pois influencia diretamente o sabor e aroma do produto final (LÜCKE e HECHELMANN, 1987).

**Quadro 2** - Principais aminoácidos originados por microrganismos durante a fermentação.

<b>Microrganismos</b>	<i><b>Pediococcus acidilactici</b></i>	<i><b>Pediococcus pentosaceus</b></i>	<i><b>Micrococcus varians</b></i>
<b>Aminoácidos</b>	Valina Leucina Glutamina Taurina	Taurina Leucina Glutamina Valina	Alanina Taurina Leucina Glutamina

Fonte: VARNAM e SUTHERLAND (1995).

Apesar do teor total de aminoácidos livres aumentar durante a fermentação do embutido, uma queda em alguns deles pode ocorrer. Queda nas concentrações de arginina, cisteína e glutamina, sendo estas particularmente significativas, podem ser explicada pelo metabolismo microbiano adicional (Quadro 3). Redução nos aminoácidos, como histidina pode ocorrer por descarboxilação. Diferenças na composição de aminoácidos em embutidos fermentados parecem ter pequeno efeito nas propriedades sensoriais, apesar do papel dos aminoácidos no desenvolvimento do aroma (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

A proteólise é afetada por diversos fatores, além do tipo de cultura utilizada. A taxa de proteólise aumenta com o uso de altas temperaturas durante a maturação; porém, deve-se observar a temperatura na qual ocorre a inativação enzimática. Altas temperaturas também podem aumentar a produção de ácido e a velocidade de queda do pH, o que leva a redução da atividade das enzimas proteolíticas. Baixos valores

de pH foram reportados como estimulantes da hidrólise de proteínas miofibrilares. O diâmetro do embutido foi identificado como um fator que afeta a proteólise, isto pode ser outro efeito relacionado ao pH, especialmente no centro de embutidos de maior diâmetro, onde o pH atinge valores particularmente marcantes (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

**Quadro 3-** Possíveis rotas metabólicas de aminoácidos durante a fermentação.

<b>Aminoácido</b>	<b>Rota</b>
Arginina	Metabolizada à ornitina.
Cisteína	Metabolizada à piruvato e sulfato ou convertida a taurina.
Glutamina	Convertida à ácido glutâmico e NH <sub>3</sub> .

Fonte: VARNAM e SUTHERLAND (1995).

O metabolismo de aminoácidos também contribui para o aumento do teor de amônia e conseqüente elevação do pH, podendo modificar o sabor e aroma dos embutidos, sendo esta influência acentuada em produtos com longos períodos de secagem (LOIS *et al.*, 1987; DEMEYER, 1992).

Não existe um consenso entre a melhor combinação de temperatura e umidade. Porém, tem-se mostrado que a umidade relativa da câmara deve ser mantida em torno de 70 – 80%, fazendo com que a água seja eliminada do produto na mesma velocidade em que chega à superfície da massa. Se este processo for acelerado pode ocorrer intensa desidratação superficial, formando uma crosta externa rígida que dificulta a perda de água do produto no decorrer do processo (TOWNSED e DAVIS, 1972).

Portanto, deve-se manter o gradiente de umidade controlado. Como regra geral, pode-se admitir que a diferença entre a umidade ambiente e o embutido seja aproximadamente de 2 - 4%; ou seja, quando o embutido tiver  $A_w = 0,94$ , a umidade relativa da câmara deve ser de 90 - 92%, considerando sempre o tamanho e calibre do mesmo. À medida que o valor de  $A_w$  decresce, como conseqüência do processo de maturação, a umidade da câmara deve ser alterada, com o objetivo de manter este gradiente (FREY, 1983).

É necessário que o embutido perca umidade, ao mesmo tempo em que se deve retirar a umidade da câmara, necessitando para tal, movimentação do ar. O movimento do ar (ventilação) não deve ser muito intenso, pois, juntamente com o

controle da umidade, pode produzir dessecação excessiva das porções periféricas, originando crostas.

Também se deve evitar a retirada de umidade em uma só direção, pois neste caso, o embutido apesar de maturado corretamente em termos gerais, apresenta partes com defeitos (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

A formação de liga é um processo físico-químico, envolvendo partículas de carne, gordura, e proteínas liberadas durante a moagem e a salga. O sal solubiliza estas proteínas, que passam para o estado “sol” e, com a redução do pH a valores inferiores a 5,3, modificam-se para o estado gelatinoso, “gel”, e atuam nos espaços entre as partículas da carne e gordura, conferindo a “liga”. Assim, ocorre um aumento de volume, tornando o produto com aparência de “cheio” (FREY, 1983).

O sabor característico destes embutidos é ácido e amargo e, se a maturação for efetuada por um período longo, o sabor ácido será forte e picante.

A acidificação é muito importante no desenvolvimento do aroma em produtos fermentados. Muitos produtos formados durante as modificações químicas e microbianas das proteínas, gorduras e carboidratos, são responsáveis pelo aroma dos embutidos. Dentre eles estão os compostos carbonílicos, aldeídos, álcoois, etc. (LUCKE, 1986; LUCKE, 2000).

A lipólise é geralmente considerada como mediada por enzimas de origem microbiana. *Micrococcus*, presente na microflora endógena da carne ou na cultura starter utilizada, são a fonte mais importante. Foi reconhecido que muitas bactérias lácticas também sintetizam exoenzimas lipolíticas. A atividade lipolítica da lipase de bactérias lácticas é significativamente menor que a atividade da enzima do *Micrococcus*. Porém, bactérias lácticas estão presentes em números elevados (SANZ *et al.*, 1998).

O máximo da produção de lipase é obtido na temperatura ótima de crescimento e em pH neutro. As bactérias lácticas contêm enzimas lipolíticas que são ativadas nas condições de fermentação e têm influência no aroma. Isso foi mostrado para *L. curvatus* e *Pediococcus pentosaceus* (PAPON e TALON, 1988; NIELSEN e KEMMER, 1989).

Mudanças oxidativas na gordura de embutidos fermentados envolvem ácidos graxos insaturados quase que exclusivamente. A oxidação lipídica é quase sempre autocatalítica e a taxa aumenta notadamente com o tempo. A oxidação pode ser catalisada por lipoxigenase ou metais, como o cobre. A oxidação conduz à formação



de peroxidase lipídica e compostos carbonila, o que em muitas circunstâncias ocasiona um aumento na formação de peróxido. Aumento de peróxido é maior quando *Lactobacillus* está envolvido, mas não foi constatada correlação entre a atividade microbiana e a atividade carbonil. A formação de peróxido é reduzida quando microrganismos altamente catalíticos estão presentes (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

## 2.4 - Secagem e Maturação

A secagem e maturação são etapas importantes, uma vez que, nelas, ocorre o desenvolvimento do aroma e estabilização da cor, finalizando a preparação para o armazenamento do produto.

A temperatura de secagem ideal é de 12 - 15°C, com umidade relativa entre 70 -75%, sendo a umidade gradativamente reduzida até o final do processo e velocidade do ar menor que 0,1 m/s. Estes parâmetros variam conforme o grau de moagem, diâmetro e tipo de tripa e se o embutido foi ou não defumado, e proporcionam, no final do processamento, o crescimento de leveduras e fungos na parte externa do embutido (CORETTI, 1977; HOLLEY, 1981).

O processo de secagem remove, normalmente, 30 a 50% da água inicial, e o produto final apresenta de 30 a 40% de umidade. Esta redução da umidade aumenta a concentração de sal para 4,0 a 5,5%, aumentando a concentração salina do embutido a 7% ou mais, inibindo o crescimento de microrganismos deterioradores da carne (FREY, 1983).

No início do período de secagem, o sabor do produto é devido ao ácido láctico e, portanto desagradável. Entretanto, à medida que este vai se transformando em lactato (cerca de 3 dias) o gosto torna-se menos azedo e o sabor torna-se agradável, forte e picante.

A secagem e a maturação são importantes estágios para a garantia da qualidade e caracterização do produto. No caso de embutidos secos contendo carne de porco, a etapa de secagem é crítica para o controle da *Trichinella* e o controle da duração e efetividade da secagem reflete isto. O monitoramento e controle da umidade relativa do ar, do fluxo de ar e da temperatura são requeridos durante a secagem. A redução da  $A_w$  pode reduzir também a sobrevivência de alguns microrganismos patogênicos, mas a eliminação não é possível (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

## 2.5 - Cultura Starter

Na elaboração de embutidos fermentados os microrganismos desempenham papel decisivo. A redução de nitrato, o decréscimo do pH, a formação do aroma, a estabilidade da cor e a capacidade de conservação, são características ou processos que se desenvolvem durante a maturação e que são significativamente influenciados de pelos microrganismos presentes .

Com o emprego de culturas starters melhora-se a elaboração de embutidos fermentados, no que diz respeito à rapidez, segurança, estabilidade e qualidade final. A cultura starter também influencia no tempo de armazenamento dos embutidos, algumas são capazes de retardar a rancificação dos embutidos, aumentando a capacidade de conservação (LUCKE, 2000).

O curso inicial da fermentação utilizando cultura starter, contendo bactérias lácticas, é essencialmente o mesmo das fermentações naturais, apesar das bactérias lácticas estarem presentes em maior quantidades desde o início (FREY, 1983).

Hoje, as culturas starter para embutidos fermentados podem ser divididas em duas categorias (BUCKENHTISKES, 1994). A primeira geração contém as bactérias lácticas originadas de material vegetal (*L. plantarum*, *P. pentosaceus*). A segunda geração contém as bactérias lácticas originadas da carne, razão pela qual são especialmente adaptadas às condições de fermentação da carne (HUGAS e MONFORT, 1997).

Os microrganismos selecionados para compor a cultura starter devem apresentar determinadas características: competir de maneira eficiente com a microbiota da carne; produzir quantidades adequadas de ácido láctico; ser tolerante ao NaCl e capaz de crescer em concentrações de até 6%; ser tolerante ao NaNO<sub>2</sub> e capaz de crescer em concentrações de até 100 mg por Kg; ser capaz de crescer em temperaturas entre 15- 40°C, com ótimo entre 30 - 37°C; ser homofermentativo; não ser proteolítico; não produzir grandes quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; ser catalase positiva; ser nitrato redutase; melhorar o sabor final de embutidos; não produzir aminas biogênicas; não produzir limo; exercer efeito antagônico frente a microrganismos patogênicos e indesejáveis; ser tolerante ou exercer efeito sinérgico com outros starters (LEISTNER *et al.*, 1979; HAMMES, 1987; PROCHASKA 1998).

Abrangendo tais características os principais grupos de microrganismos utilizados pela indústria de embutidos secos e semi-secos englobam (LUCKE, 1985; HAMMES *et al.*, 1990; RODRIGUEZ *et al.*, 1994; JESSEN, 1995):

1. Grupo das bactérias ácido-láticas homofermentativas: *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus sake*; *Lactobacillus curvatus*; *Lactobacillus pentosus*; *Lactobacillus jensenii*; *Pediococcus acidilactis*; *Pediococcus pentosaceus*
2. Grupo de cocos catalase positivo: *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, *Micrococcus varians*;
3. *Streptomyces griseus*
4. Leveduras e mofos, principalmente como flora de cobertura.

O Quadro 4 resume as atividades metabólicas e o benefício do uso de diferentes microrganismos.

*Pediococcus*, assim como *Lactobacillus*, são utilizados em produtos cárneos por serem homofermentativos. BLICKSTAD e MOLIN (1981) mostraram que a produção de ácido por *Pediococcus pentosaceus* está intimamente relacionada ao crescimento. Além disto, esta espécie é capaz de crescer em ambientes variados, com amplos limites. Tem grande tolerância ao nitrito, atmosferas aeróbicas e anaeróbicas e se adapta bem em ampla faixa de pH. Temperaturas em torno e abaixo de 20°C resultam em grande queda da taxa de crescimento.

TETLOW e HOOVER (1988) demonstraram que *Pediococcus pentosaceus* produz, além de lactato, acetato e etanol a partir de pentoses e hexoses, em condições não controladas. Em particular, a quantidade de etanol é maior na fermentação de hexoses, o que pode explicar porque pediococci é responsável por atribuir sabor menos pungente, do que lactobacilli, em embutidos fermentados.

Em contraste com as bactérias lácticas, os membros da família *Micrococcaceae* usualmente possuem catalase, são sensíveis à acidez e mais tolerantes a baixas atividades de água. São capazes de se multiplicar e manter elevado número de células durante a maturação de embutidos. Ao contrário dos micrococcos, *Staphylococcus* são capazes de crescer em condições de anaerobiose e fermentar a glicose (LUCKE *et al.*, 1986; CHANDLER e McMEEKIN, 1989).

**Quadro 4** - Desempenho de diversos microrganismos utilizados como starter.

<b>Grupos</b>	<b>Gênero/ Espécie</b>	<b>Ativ. Metabólica</b>	<b>Benefícios</b>
<b>Bactérias láticas</b>	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. sake</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. pentosus</i> <i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i>	Formação de ácido lático	Inibição de bactérias patogênicas e deteriorantes.  Aceleração da formação da cor e tempo de secagem.
<b>Cocos catalase positiva</b>	<i>Micrococcus varians</i> <i>M. lutens</i> <i>M. roseus</i> <i>Staphylococcus carnosus</i> <i>S. xylosus</i>	Redução de nitrato e consumo de oxigênio.  Destruição de peróxidos.  Lipólise.  Redução de nitrato.	Formação e Estabilização da cor.  Retardamento de oxidação.  Desenvolvimento de aroma.  Remoção de nitrato em excesso.
<b>Leveduras</b>	<i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Candida formata</i>	Consumo de oxigênio.  Lipólise.	Retardamento da oxidação.  Desenvolvimento de aroma.
<b>Bolores</b>	<i>Penicillium nalgiovensis</i> <i>P. crysogenum</i>	Consumo de oxigênio.  Destruição de peróxidos.  Oxidação de lactato.  Proteólise.  Lipólise.	Estabilidade da cor.  Retardamento da oxidação.  Desenvolvimento de aroma.

Fonte: LUCKE (1994).

Quando se utiliza starter, a adição de aditivos como, nitrato, nitrito e, sobretudo, as combinações de açúcar devem estar de acordo com o tipo de microrganismo utilizado. Se trabalha-se somente com cultivos redutores de pH, é conveniente utilizar sal de cura (nitrito). Quando se empregam combinações de espécies microbianas redutoras de nitrato e acidificadoras, pode-se trabalhar com sal comum (NaCl) e nitrato de potássio. Como os microrganismos da cultura starter são capazes de desdobrar rapidamente os carboidratos, pode ser necessário diminuir a quantidade de açúcar adicionado, pois agregando doses excessivas, pode haver acidificação inicial muito intensa, o que acarreta defeitos na consistência e sabor dos embutidos (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

Em peças defeituosas é comum verificar a presença de microrganismos indesejáveis, que não permitem a ocorrência da maturação de forma esperada, conduzindo-a por vias indesejáveis.

### **2.5.1 – Efeitos positivos do uso da cultura starter**

As bactérias láticas, exceto em condições excepcionais, em geral, acumulam peróxido de hidrogênio no meio de crescimento. O peróxido acumulado afeta adversamente as características sensoriais do produto cárneo, provocando alterações oxidativas nas gorduras, rancidez e defeitos na coloração, tal como o aparecimento de uma coloração esverdeada indesejável, ainda que, por um lado, exerça efeito inibidor sobre microrganismos. Por esta razão os microrganismos selecionados para uso como starters devem possuir atividade catalase eficaz, assegurando desta forma a destruição de peróxido do substrato e, portanto, a estabilização da cor e aroma do produto (JUVEN *et al.*, 1988).

A atividade catalase dos cultivos iniciadores é geralmente atribuída às *Micrococaceas*. *Micrococos* nitrato redutase e *Staphylococos* coagulase negativa, produzem catalase, que remove o peróxido de hidrogênio produzido por algumas bactérias láticas (LUCKE, 1986; MARCHESINI *et al.*, 1992).

Os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias láticas via fermentação, além de proverem as características peculiares do embutido fermentado, também exercem efeito antimicrobiano quando na sua forma não-dissociada (BAIRD-PARKER, 1980).

As primeiras candidatas a culturas protetoras são as bactérias láticas, dado que são capazes de suprimir o crescimento de outros microrganismos de diversas

maneiras, dentre elas, o abaixamento do pH, a produção de ácido láctico, a produção de ácido acético, a competição por nutrientes, a produção de peróxido de hidrogênio, a produção de bacteriocinas e a produção de antibióticos (SCHILLINGER e LUCKE, 1990).

Microrganismos acompanhantes podem ser excluídos em função da competição por nutrientes e pela produção de peróxido de hidrogênio, que tem efeito inibidor sobre diversos microrganismos. A habilidade de certas bactérias lácticas em produzir peróxido, para embutidos fermentados é algumas vezes indesejável, pois este pode afetar negativamente a cor e antecipar a rancificação (LUCKE, 1986).

O peróxido de hidrogênio é citotóxico, devido ao efeito oxidativo de sua molécula. O efeito bactericida aumenta com a acidez, sendo a membrana citoplasmática o principal alvo na célula. Os sistemas lactoperoxidases são enzimas, como superóxido dismutase, catalase e peroxidase, produzidas por bactérias lácticas e que catalisam a reação entre peróxido de hidrogênio e tiocianato, produzindo o hipotiocianato, que é um radical tóxico (JUVEN *et al.*, 1988).

O diacetil é um produto final do metabolismo de bactérias lácticas, que é sintetizado a partir do piruvato. Esse composto, um dos principais agentes de sabor, possui ação antimicrobiana, sendo mais efetivo contra bactérias gram-negativas e fungos do que contra bactérias gram-positivas (JAY, 1992).

As bacteriocinas são proteínas que têm atividade bactericida. São utilizadas pelo efeito preservativo, podendo ser adicionadas ou naturalmente produzidas em alimentos. Podem também inibir microrganismos patogênicos e deterioradores (JAY, 1992). Algumas bacteriocinas produzidas por *Pediococcus* e *Lactobacillus* podem inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* (RODRIGUEZ *et al.*, 1994).

O emprego de culturas starters permite também reduzir o risco da formação de histamina e tiramina em embutidos fermentados secos, ao mesmo tempo em que diminuem a possibilidade de desenvolvimento da microbiota que possui tirosina e histidina descarboxilase e atividade proteolítica necessárias à formação de histamina e tiramina (BACUS, 1984; SMITH e PALUMBO, 1983).

Pela imposição de diversos obstáculos durante o processamento dos embutidos fermentados, os microrganismos patogênicos são inibidos e os microrganismos desejáveis são favorecidos.

A estabilidade microbiana dos embutidos fermentados é alcançada pela seqüência de cinco obstáculos: conservantes, potencial redox, flora competitiva, pH

e atividade de água. Estes obstáculos inibem o crescimento de diversos microrganismos patogênicos importantes, tais como, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e ainda de bactérias responsáveis pela deterioração do produto (LEISTNER, 1994). Nas etapas iniciais da maturação a inibição ocorre através do sal e nitrito adicionados, que inibem a maioria das bactérias, inclusive *Salmonella*. Com o decréscimo da atividade de água para 0,96 - 0,97, ocorre a inibição dos microrganismos aeróbios gram negativos. Quando a atividade de água atinge 0,92 todas as bactérias, à exceção do *Staphylococcus aureus*, que necessita da imposição de outras barreiras, têm seu crescimento inibido (AGUILERA, 1994). Com o decréscimo do pH e a redução do oxigênio disponível, há favorecimento da flora láctica, micrococos e estafilococos não patogênicos e inibição de microrganismos, tais como pseudomonas.

O Quadro 5 mostra o modo de ação de bactérias lácticas e cocos catalase positiva utilizados como cultura starters na fermentação de embutidos.

**Quadro 5** - Ação de culturas starters em embutidos fermentados.

<b>Características de qualidade</b>	<b>Modo de ação</b>	<b>Bactérias lácticas</b>	<b>Cocos catalase positiva</b>
<b>Cor</b>	Redução do nitrato	-	+++
	Decréscimo do pH	+++	-
	Consumo de oxigênio	-	++
	Degradação do peróxido	-	++
<b>Aroma</b>	Produção de ácido	+++	-
	Proteólise	-	+
	Lipólise	-	++
	Capacidade antioxidante	-	++
<b>Consistência</b>	Decréscimo do pH	+++	-
<b>Preservação</b>	Decréscimo do pH	+++	-
	Redução do nitrato	-	++
	Supressão de mo indesejáveis	++	-
	Degradação de nitrito	+	++

+++ Importância decisiva, ++ Importante, + Efeito discreto, - Sem efeito.

Fonte : LUCKE e HECHELMANN (1987).

A presença de culturas starters fornece um número de microrganismos suficiente para assegurar a predominância sobre a microbiota natural, incluindo

microrganismos patogênicos, e em combinação com os controles próprios do processamento, garante a segurança do produto final (STILES, 1994).

Espécies de *Micrococcus* e *Staphylococcus* coagulase negativa utilizadas como starter produzem quantidade limitada de ácido e são adicionadas, principalmente para reduzir o nitrato a nitrito e auxiliar na formação da cor. *Staphylococcus carnosus* é associado à melhoria de cor e aroma, em embutidos contendo nitrito, onde a redução do nitrato não é significativa (FREY, 1983).

O papel relativo de enzimas de origem microbiana e seus derivados na produção de flavor é objeto de debate, mas *Staphylococcus carnosus* parece exercer contribuição positiva para o flavor de embutidos fermentados (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

## 2.6 - Leveduras

Em uma definição simples, pode-se considerar que as leveduras são fungos unicelulares, em contraposição aos fungos filamentosos que são multicelulares. Não obstante, esta não é uma definição exata, já que alguns microrganismos considerados normalmente como leveduras, produzem micélios em quantidades variáveis. As leveduras são células eucariotas e heterotróficas, possuem uma parede rígida e se reproduzem sexuada ou assexuadamente. A maioria das que têm importância em alimentos se divide por gemação ou por fissão. Visualmente, podem ser diferenciadas das bactérias pelo maior tamanho de suas células e pela sua forma ovalada, alargada, elíptica ou esférica. As células típicas de leveduras têm um diâmetro que oscila entre 5 e 8  $\mu\text{m}$ , sendo algumas inclusive de maior tamanho. Os cultivos velhos de leveduras tendem a ter células de menor tamanho. São capazes de crescer dentro de amplos intervalos de pH ácido e em concentrações de etanol de até 18%. Algumas leveduras crescem em concentrações de sacarose de 55-60%. Algumas leveduras produzem pigmentos, cuja cor varia do amarelo claro ao vermelho, passando pelo rosa (JAY, 1992).

Em pH 5.5, bactérias são inibidas e as leveduras ácido-tolerantes crescem. Portanto, em produtos fermentados por bactérias lácticas, o abaixamento do pH permite o crescimento das leveduras (DEKETELERA, 1974).

As leveduras estão normalmente presentes em pequeno número na microbiota da carne. Sua capacidade de crescimento a baixas temperaturas, altas concentrações de sal e baixa tensão de oxigênio, as habilita à proliferar em carnes e



produtos derivados refrigerados, curados e embalados a vácuo. Nestes alimentos não são consideradas como deteriorantes de importância. DILLON e BOARD (1991) e DILLON (1998) discutiram a origem dos diferentes gêneros de leveduras encontrados nos produtos cárneos, demonstrando que a rota de contaminação com estes microrganismos começa no campo, passando pelos abatedouros e chegando até a planta de processamento.

Nos produtos cárneos curados e/ou fermentados, provavelmente a baixa atividade de água, assim como baixos valores de pH são os principais fatores de seleção da microbiota leveduriforme (DILLON e BOARD, 1991).

A inclusão das bactérias no desenvolvimento de culturas starter têm sido investigado freqüentemente, enquanto pouca atenção foi dada ao papel das leveduras na fermentação dos salames (JESSEN, 1995; ZEUTHEN, 1995). Os trabalhos pioneiros sobre a flora leveduriforme presente em embutidos fermentados foram conduzidos por CESARI (1919) e CESARI e GUILLIERMOND (1920), que estabeleceram a importância do 'fleur du saucisson' e recomendaram o uso de culturas puras de leveduras para melhorar o flavor em embutidos fermentados (LIEPE, 1981). O trabalho executado por JAY e MARGITIC (1981) mostrou que na carne fresca, foram encontradas baixas contagens de leveduras ( $2 \times 10^1$  a  $6,2 \times 10^4$  Log UFC/g), que corresponde aos encontrados por DYETT e SHELLEY (1966) e DOWELL e BOARD (1968), que mostram que as leveduras são contaminantes comuns dos embutidos fermentados. Diversos estudos têm tratado da participação de leveduras na maturação de produtos cárneos secos, contribuindo para as características organolépticas destes produtos (INIGO *et al.*, 1970; COMI e CANTONI 1983; SMITH e PALUMBO, 1983; ARNAU *et al.*, 1987; ABUNYEWA, 2000).

Leveduras têm sido consideradas pouco importantes no processo de deterioração da carne devido ao seu baixo número inicial e por seu crescimento lento em temperaturas de refrigeração, o que desfavorece a competição eficiente com bactérias psicrófilas (DEKETELERA, 1974).

A maioria das espécies de leveduras foi considerada, durante muito tempo, apenas como microrganismos deteriorantes da carne e dos produtos cárneos. As leveduras metabolizam ácidos orgânicos (lático, acético, cítrico), provocando uma elevação do pH e redução na concentração das substâncias protetoras do alimento, favorecendo, desta forma, o crescimento de microrganismos indesejáveis

(WALKER, 1977). Leveduras deterioradoras são oportunistas e proliferam quando há um pequeno número de bactérias competidoras. Portanto, são importantes contaminantes em produtos cárneos de baixo pH, fermentados por bactérias lácticas e carnes processadas ou curadas com baixa atividade de água (DEKETELERA, 1974).

Os embutidos fermentados são considerados bons substratos para o crescimento das leveduras. Nestes produtos, os microrganismos competidores tais como as bactérias gram-negativas, são inibidos por fatores como o abaixamento do pH, a presença de ácido láctico e nitrito, e a baixa atividade de água (DILLON, 1998). Estudos realizados com a utilização de diferentes leveduras como starter, principalmente *D.hansenii*, mostraram a contribuição destas no desenvolvimento da cor, pela remoção do oxigênio, e do flavor (JESSEN, 1995), devido a sua habilidade de degradar peróxidos, a atividade lipolítica e, ainda, em menor grau, a atividade proteolítica (LUECKE, 1985; LEISTNER, 1986). Além disso, as leveduras quando na superfície, protegem os salames dos efeitos adversos da luz (LUCKE e HECHELMANN, 1987).

De acordo com GEISEN, LUCKE e KROCKEL (1992), a exigência da levedura por oxigênio restringe seu crescimento principalmente perto da superfície do salame. Espécies fermentativas de levedura, entretanto, podem prosperar sob baixas tensões de oxigênio, desde que requeiram oxigênio somente para a produção de constituintes da parede celular, tais como esteróis e aminoácidos (DEAK e BEUCHAT, 1996).

Embora diversos fatores possam influenciar a microbiota de embutidos fermentados, a presença das leveduras em níveis entre 3 e 5 unidades logarítmicas por g durante toda à manufatura de embutidos parece ser uma constante e sugere a participação deste grupo de microrganismos, particularmente *D. hansenii*. Neste contexto, deve-se recordar que a biomassa de células de levedura é aproximadamente 100 vezes maior que a biomassa da célula bacteriana (DILLON e BOARD, 1991).

*D.hansenii* é a levedura dominante em carnes e produtos cárneos. Sua presença em níveis elevados em todos os estágios da manufatura, especialmente em embutidos tradicionais com as características organolépticas mais desejadas, sugere possível contribuição ao flavor destes produtos. Esta espécie é caracterizada por sua tolerância ao sal e ao nitrato, e elevada demanda de oxigênio, sendo, portanto, a

principal levedura utilizada como starter em produtos cárneos (LEISTNER e BEM, 1970; MONTE *et al.*, 1986; DEAK, 1991; JESSEN, 1995).

Espécies do gênero *Debaryomyces* predominam em embutidos secos, devido a sua elevada tolerância ao sal (LEISTNER e BEM 1970; COMI e CANTONI 1980; ABUNYEWA, 2000). ROSSMANITH *et al.* (1972) relataram que a cura, a cor e o flavor dos embutidos poderiam ser melhorados pela adição de espécies selecionadas de *Debaryomyces* como a parte da cultura starter. CORETTI (1977) confirmou estas afirmações e reforçou que o uso de uma combinação de *D. hansenii*, lactobacilos e micrococcos, resultou no melhor desenvolvimento do flavor e do sabor dos embutidos.

A posição do gênero *Debaryomyces* dentro do sistema de classificação das leveduras ascospórogenas, segundo o estudo taxonômico realizado por KURTSMAN e FELL (1998) mostra:

**Phylum: Ascomycota**

Classe: *Hemiascomycetales*

Ordem: *Saccharomyces*

Família: *Saccharomycetaceae*

Gênero: *Debaryomyces*

As diferentes espécies pertencentes ao gênero *Debaryomyces*, que possuem estirpes isoladas de algum tipo de alimento, podem ser vistas abaixo:

1. *Debaryomyces carsonii*
2. *Debaryomyces etchellsii*
3. *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii*  
var. *fabryi*
4. *Debaryomyces maramus*
5. *Debaryomyces melissophilus*
6. *Debaryomyces polymorphus*
7. *Debaryomyces pseudopolymorphus*
8. *Debaryomyces robertisiae*

A utilização eficiente de aminoácidos específicos e/ou peptídeos gerados por leveduras fornece uma vantagem competitiva e contribui para a estabilidade das bactérias lácticas (GOBBETTI, 1998).

MEISEL *et al.* (1989), encontraram efeitos inibitórios de *D. hansenii* frente a *S. aureus*. Este efeito não foi perdido em culturas mistas; ao contrário, apresentaram

efeito sinérgico. OLESEN *et al.* (2000) atribuíram o efeito inibitório de *D. hansenii* ao consumo de oxigênio.

Os resultados do estudo realizado por GENHLEN *et al.* (1991) mostraram que *D. hansenii* exerce forte influência na composição microbiológica e química de embutidos fermentados secos, podendo ainda contribuir na formação do sabor e da cor superficial destes embutidos (OLESEN *et al.*, 2000).

Nos produtos inoculados com levedura pode-se observar um aumento do pH, atribuído à utilização do lactato e acetato e à produção de amônia, em razão da ocorrência de proteólise (COOK, 1995).

A atividade proteolítica e lipolítica de leveduras como *Debaryomyces hansenii*, pode ser importante na cura e maturação de embutidos (COMI e CANTONI, 1983), apesar de HUERTA *et al.* (1988) terem mostrado que as leveduras isoladas de embutidos secos espanhóis apresentaram atividade lipolítica, mas não atividade proteolítica.

Em muitos embutidos fermentados, o crescimento de fungos e leveduras fora da tripa desempenha um importante papel no desenvolvimento de características organolépticas do produto. Desempenham também importante papel na supressão do desenvolvimento de bactérias indesejáveis, proteção contra luz e oxigênio e produção de catalase (RODEL *et al.*, 1993).

Culturas contendo fungos comercialmente disponíveis apresentam em sua composição *Penicillium*, *Penicillium nalgiovense*, os mais utilizados, e ainda *Penicillium expansum* e *Penicillium chrysogenum* também viáveis (GEISEN, 1993).

Culturas de fungos são obtidas por liofilização da suspensão de células; e culturas de leveduras pela liofilização de células. As suspensões são preparadas em cubas com água dentro das quais o embutido é colocado, atentando-se sempre para a necessidade de sanitização destes equipamentos para prevenir o desenvolvimento de fungos do ambiente (VARNAM e SUTHERLAND, 1995).

## **2.7 – Aminas Bioativas**

Aminas bioativas (AB) são bases orgânicas alifáticas ou heterocíclicas de baixo peso molecular; são formadas e convertidas pelo metabolismo fisiológico de homens, animais, plantas e microrganismos (Figura 1).

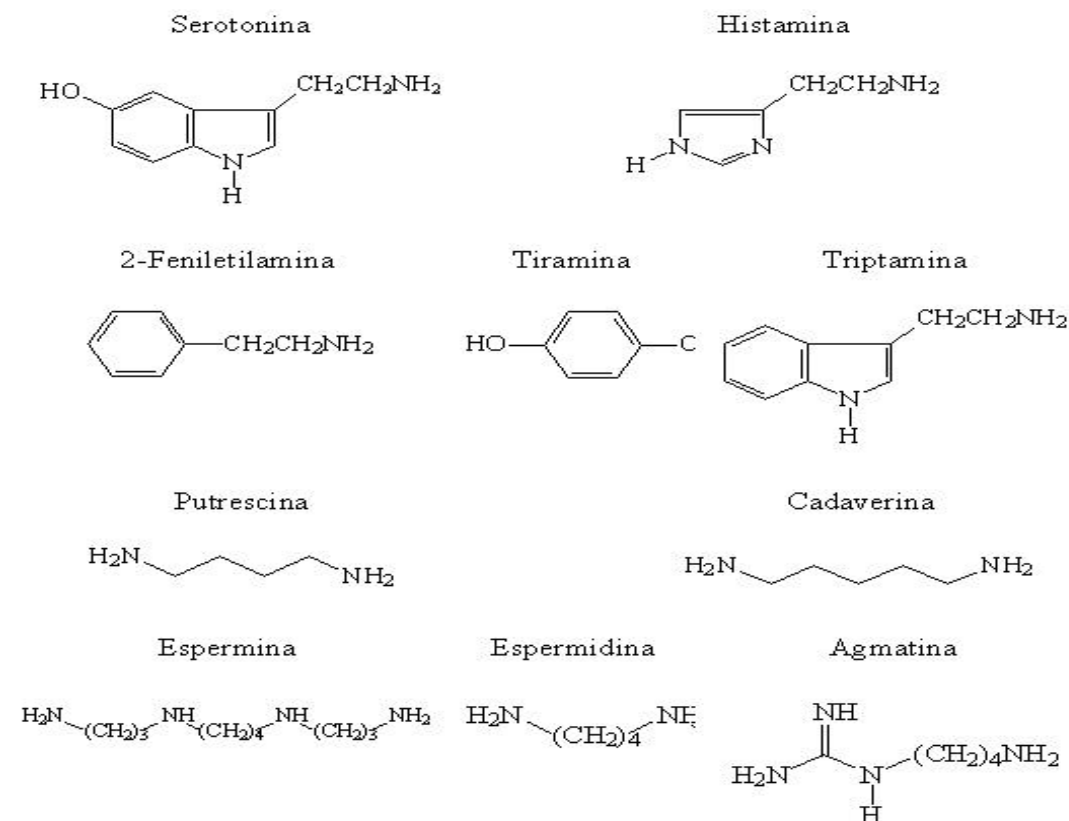


Figura 1 - Estrutura química de algumas aminas bioativas (GLÓRIA, 2003).

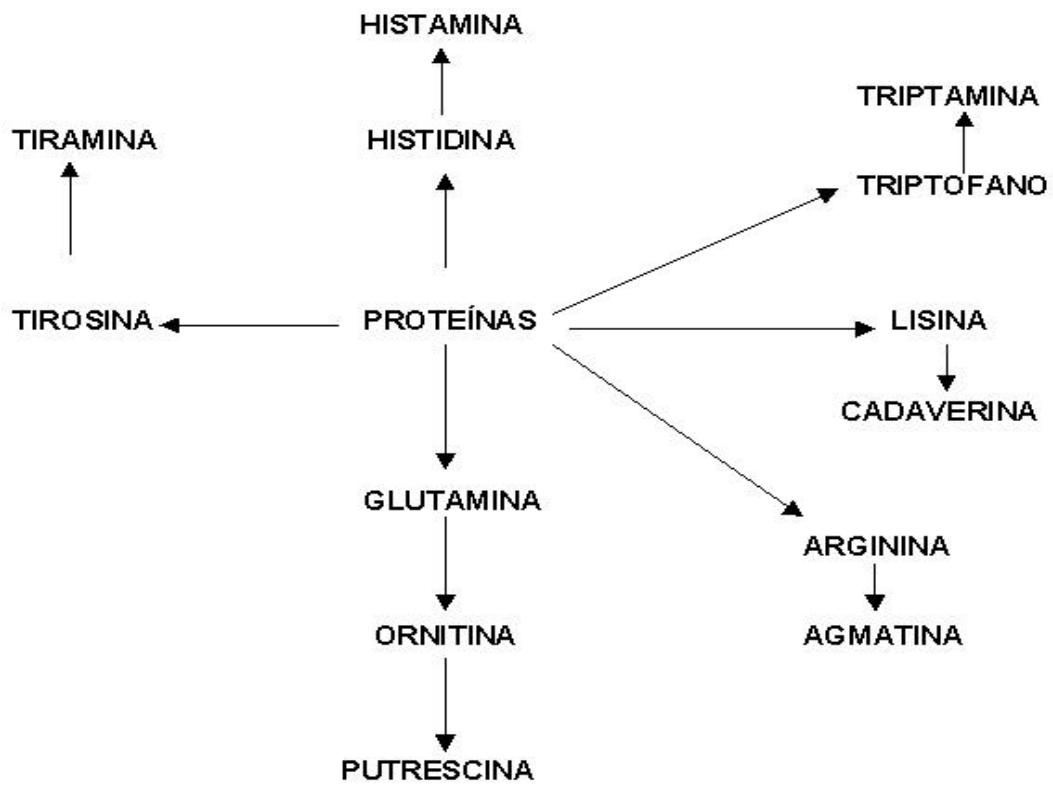
As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina na molécula, da estrutura química e da via biossintética. Quanto ao número de grupamentos amina, se classificam em monoaminas (tiramina e 2-feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermina, espermidina e agmatina). Quanto à estrutura química, se classificam em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina), aromáticas (tiramina e 2-feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina). Quanto a via biossintética, as aminas se classificam em poliaminas naturais são formadas durante a biossíntese “*in situ*”, ou seja, a partir de uma molécula mais simples, à medida em que são requeridas (putrescina, agmatina, espermina e espermidina) ou quando são armazenadas nos mastócitos e basófilos (histamina) e em aminas biogênicas quando são formadas por reações não específicas de descarboxilação conduzidas por descarboxilases bacterianas, sendo esta a principal via de formação de aminas em alimentos (histamina, serotonina, tiramina, 2-feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) (RICE *et al.*, 1976; MAGA, 1978; BARDOCZ, 1995; LIMA e GLÓRIA, 1999).

As aminas também podem ser formadas por aminação de aldeídos, transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados e decomposição térmica (BARDOCZ, 1995).

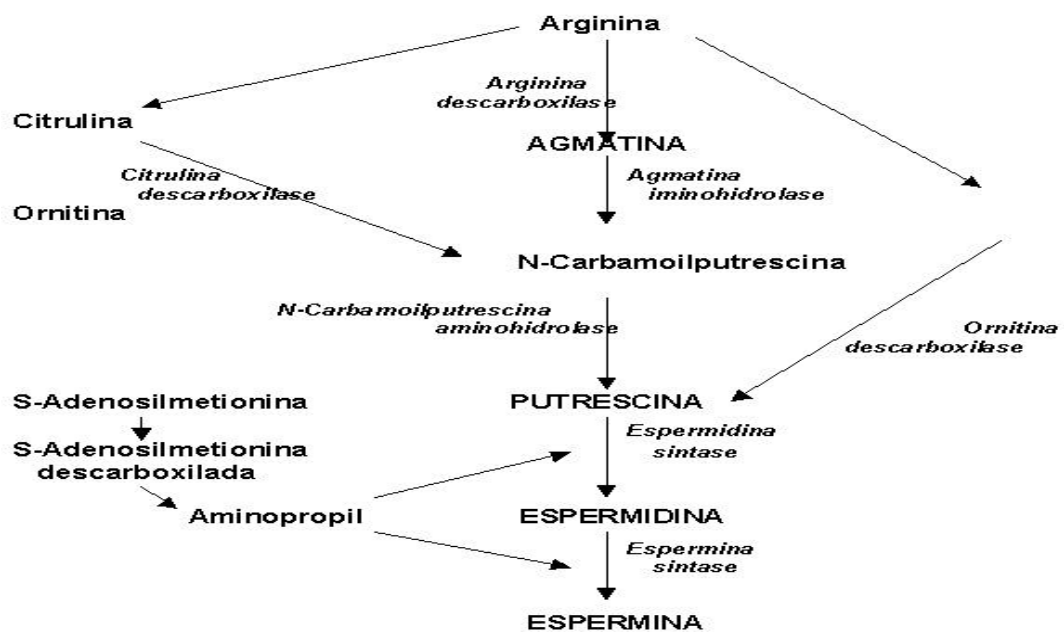
Algumas aminas são formadas pela descarboxilação microbiana de aminoácidos. Histamina é formada a partir da histidina, tiramina a partir da tirosina, cadaverina a partir da lisina e putrescina a partir da ornitina (Figura 2 e 3). A produção de aminas bioativas requer a presença de microrganismos capazes de produzir descarboxilase e um cofator conveniente. Quando estão presentes aminoácidos em concentrações adequadas e fatores que favoreçam o crescimento, as bactérias se desenvolvem e sintetizam descarboxilase. Os principais aminoácidos que sofrem descarboxilação são: tirosina, histidina, triptofano, tiramina, histamina, triptamina. As aminas são geralmente, psicoativas ou vasoativas, envolvidas com as funções vitais em homens e animais (BUCKENHUSKEN, 1993; SILLA SANTOS, 1996; PAULSEN *et al.*, 1997).

Poliaminas desempenham papel importante em diversas funções fisiológicas de humanos e animais (BRINK *et al.*, 1990). Espermina e espermidina estão envolvidas na síntese de DNA, RNA e de proteínas, sendo essenciais no crescimento e duplicação da célula (BARDÓCZ *et al.*, 1993). Por outro lado, aminas biogênicas são usualmente produzidas durante o processo final de quebra das proteínas, através da descarboxilação enzimática, de origem bacteriana, de aminoácidos livres.

O trato intestinal dos mamíferos possui um eficiente sistema de desintoxicação, no qual enzimas monoaminas oxidase (MAO) e diaminas oxidase (DAO) têm papel importante. Por isso, o consumo de alimentos contendo pequenas concentrações de aminas biogênicas não é arriscado, a não ser que o sistema de desintoxicação seja inativo ou geneticamente deficiente. Em grandes concentrações, porém, há efeitos toxicológicos. Os principais sintomas são: náuseas, distúrbios respiratórios, ondas de rubor, transpiração, palpitação, dor de cabeça, erupções na pele, feridas na boca, hiper/hipotensão (RICE *et al.*, 1976).



**Figura 2** - Vias metabólicas para a formação de aminas biogênicas (HALÁSZ *et al.*, 1994).



**Figura 3** - Vias biossintéticas de agmatina, putrescina, espermidina e espermina (SMITH, 1985; BARDÓCZ, 1995).

As aminas biogênicas aromáticas (histamina, tiramina, serotonina, B-feniletamina, triptamina) foram reportadas como vasoativas ou psicoativas e foram associadas à intoxicação, indução alimentar de enxaquecas e severas crises hipertensivas devido à interação com inibidores de monoamina oxidase (MARINÉ-FONT *et al.*, 1995). Além disto, diaminas, como putrescina e cadaverina podem gerar nitrosaminas carcinogênicas na presença de nitritos (SCANLAN, 1983; BRINK *et al.*, 1990). Estes compostos podem, ainda, ter odor desagradável e, também, agmatina, espermina e espermidina, putrescina e cadaverina podem inibir a atividade de aminopeptidases musculares (VIDAL-CAROU *et al.*, 1990; FLORES *et al.*, 1996).

Altas concentrações de aminas biogênicas são freqüentemente encontradas em alimentos fermentados, durante o período de maturação ou armazenamento, como exemplo, produtos cárneos e queijos (PAULSEN, 1997).

Aminas biogênicas constituem um risco potencial a saúde, especialmente em conjunto com fatores de risco adicionais, tais como inibidores de monoamina oxidase, álcool, e distúrbios gastrintestinais (STRATTON, 1991).

Limites legais para histamina estão estabelecidos somente para peixes e derivados. No entanto, níveis toxicológicos têm sido propostos: 100 mg histamina/Kg de alimento, 2 mg histamina/litro de bebida alcoólica, e 80-100 mg tiramina/Kg de alimento e 30 mg  $\beta$ -feniletamina/kg de alimento. Putrescina e cadaverina foram reconhecidas como potenciadores de toxicidade da histamina e tiramina, mas não há recomendações de níveis (VIDAL-CAROU *et al.*, 1990; HALÁSZ *et al.*, 1994). McCABE (1996) reportou que o consumo de 6 mg de tiramina pode produzir discreta reação, enquanto o consumo de 10-25 mg causa forte dor de cabeça e hemorragia intracraniana em pacientes sob tratamento com inibidor de monoamina oxidase. Além disso, aminas secundárias como putrescina e cadaverina, podem interagir com amina oxidases de modo a impedir a desintoxicação de tiramina e/ou histamina.

Aminas biogênicas têm sido consideradas bons indicadores da deterioração de alimentos (HALÁSZ *et al.*, 1994). Estas aminas podem ocorrer como resultado do crescimento e do metabolismo bacteriano em carnes e são indicadores de extensa contaminação. Além do mais, aminas biogênicas podem ser encontradas como consequência de intensa atividade microbiana durante a fermentação, processo básico na produção de salame (HERNÁNDEZ-JOVER *et al.*, 1996).



Alguns pré-requisitos para a formação de aminas biogênicas incluem (HUIS, 1990):

- a disponibilidade de aminoácidos livres, que podem ocorrer naturalmente no alimento; mas, na maioria das vezes, são liberados das proteínas como resultados de atividade proteolítica;
- presença de microrganismo descarboxilase positiva.;
- condições que permitam o crescimento bacteriano, a síntese de descarboxilases e sua atividade;

Inúmeras espécies bacterianas têm se mostrado ativas na produção de aminas, dentre elas, representantes da família Enterobacteriaceae e certos *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Enterococcus* (HALÁSZ *et al.*, 1994).

Bactérias lácticas produtoras de aminas, como, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens* (*Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens*, respectivamente) e *Lactobacillus hilgardii* foram isolados da carne e produtos cárneos. Em salame a síntese de histamina foi associada a presença bactérias gram negativas como, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter freundii* e *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratum* e poucas bactérias gram positivas, incluindo micrococci e staphylococci (SILLA SANTOS, 1996).

Considerando esses fatores, a presença de aminas biogênicas pode ser esperada, especialmente, em produtos obtidos por fermentação espontânea, sem definição da biota microbiana. Recomenda-se, portanto, selecionar bactérias ácido-láticas que não apresentem capacidade de produzir aminas biogênicas (BRINK *et al.*, 1990; BUCKENHUSKEN, 1993).

Alterações em aminas biogênicas, valores de atividade de água, contagem de aeróbios, ácido láctico, enterobactérias e pseudomonas foram observados durante a produção de embutido fermentado tipo salame. O efeito de duas culturas starters, *Lactobacillus plantarum*/*Micrococcus carnosus* e *Pediococcus pentosaceus*/*Micrococcus carnosus*, foram pesquisadas quanto à produção de aminas biogênicas e 30% das espécies foram relatadas como produtoras de tiramina (LLANO *et al.*, 1998).

Segundo LLANO *et al.* (1998), o uso de carne estocada por longos períodos resultou em altas concentrações de putrescina e tiramina no produto final. Altas concentrações de histamina foram encontradas somente com a adição de bactérias

específicas para sua formação, fator este que se mostrou intensificado pelo uso de carne estocada por longos períodos. Com a utilização de carne fresca, o conteúdo de aminas biogênicas foi baixo. A adição da cultura starter não se mostrou capaz de reduzir a formação de aminas biogênicas. Em contraste com diferentes conteúdos de aminas, embutidos fermentados produzidos com carne fresca e carne estocada por longo tempo apresentaram contagens microbianas similares.

Ebutidos fermentados produzidos com utilização de culturas starter, quando comparados com aqueles produzidos por fermentação espontânea, apresentam níveis mais baixos de tiramina, putrescina e cadaverina (LLANO *et al.*, 1998). Ocorreu redução nos níveis de espermina e os níveis de espermidina se mantiveram constantes para uma contagem microbiana total.

A flora natural presente inicialmente na carne e na gordura de porco parece ter forte influência na produção de aminas biogênicas durante a maturação do embutido fermentado segundo LLANO *et al.*, (1998).

Estudos indicaram a ocorrência de altos níveis de algumas aminas biogênicas em embutidos fermentados vendidos em supermercados na Espanha (VIDAL-CAROU *et al.*, 1990). A manufatura de embutidos fermentados oferece condições favoráveis à formação de aminas biogênicas, tais como a contagem microbiana pode ser elevada e o processo de produção pode ser longo permitindo um certo grau de proteólise e finalmente condições de baixa acidez no produto, o que pode favorecer a descarboxilação de aminoácidos (RICE *et al.*, 1976).

HERNÁNDEZ-JOVER *et al.* (1997) realizaram a detecção e quantificação por HPLC, de aminas em embutidos. Espermina e espermidina foram as únicas aminas sempre detectadas em carnes e produtos cárneos em níveis entre 60,2 – 72,2 mg/Kg de espermina e 6,0 -7,6 mg/Kg de espermidina. Os níveis de tiramina, histamina, putrescina e cadaverina apresentaram grande variação, especialmente em produtos maturados e entre amostras de mesma marca comercial. 40% dos produtos maturados apresentaram níveis em torno de 300 mg/Kg. Altos níveis de aminas em alguns produtos cozidos podem ser relacionados com a baixa qualidade da carne utilizada.

As drogas inibidoras das monoaminoxidases (IMAO) devem ser monitoradas visto que bloqueiam a desaminação de algumas aminas primárias. O uso destas drogas tem sido relatado nos tratamentos de tuberculose, pacientes em crise depressivas, hipertensos, portadores de malária. As IMAO facilitam a absorção

intestinal de tiramina e histamina, e potencializam as suas reações (RICE *et al.*, 1976).

A proteólise durante a fermentação de produtos cárneos é favorecida pela desnaturação das proteínas em consequência da acidez, desidratação e ação do cloreto de sódio. Compostos nitrogenados não protéicos são formados como resultado da atividade enzimática de microrganismos nas proteínas miofibrilares da carne. Além disso, tem sido reportado que durante a fermentação da carne, a atividade de proteases endógenas e também microbianas modificam a composição de compostos nitrogenados não protéicos. Durante a maturação de embutidos fermentados, um aumento de substâncias nitrogenadas não protéicas usualmente acontece, no qual podemos incluir aminoácidos livres. Portanto, a determinação de substâncias nitrogenadas não protéicas e do índice de proteólise, podem ser úteis no estudo do potencial de relação entre proteólise e a formação de aminas biogênicas em embutidos fermentados (PAULSEN *et al.*, 1997).

A fermentação de embutidos secos oferece condições favoráveis para a formação de aminas biogênicas, uma vez que os fatores essenciais estejam presentes, isto é, crescimento microbiano por alguns dias, um certo grau de proteólise dando origem à presença de aminoácidos livres que são precursores de aminas biogênicas e o desenvolvimento de acidez podem favorecer a descarboxilação de aminoácidos. As bactérias podem ser estimuladas a produzir enzimas descarboxilase em alguns meios ácidos como parte do sistema defensivo, contra condições adversas (EITENMILLER *et al.*, 1978; SELGAS, 1993; HIERRO *et al.*, 1999).

A enzima tirosina descarboxilase foi encontrada em diferentes grupos de microrganismos, principalmente enterococci, mas também em bactérias lácticas, enterobactérias e pseudomonas. Diferentes estudos indicaram a atividade da tirosina descarboxilase em microrganismos usualmente presentes em embutidos fermentados, mas há pouca informação sobre microrganismos produtores de tiramina presentes em material cru, antes do processo de maturação (MAIJALA e EEROLA, 1993).

Embora, bactérias lácticas tenham sido reportadas como responsáveis pela produção de aminas em produtos cárneos, o seu uso como cultura starter possibilita também retardar a formação de aminas biogênicas durante a fermentação de embutidos (MAIJALA e EEROLA, 1993).

Em referência à formação de aminas biogênicas por Micrococcaceae, MASSON *et al.* (1996) observaram que *Staphylococcus carnosus* e *Staphylococcus xylosus* podem ser utilizados como cultura starter segura de acordo com a produção de tiramina *in vitro*. Todavia, STRAUB *et al.* (1995) encontraram que *S. carnosus* tem um marcante potencial para produção de aminas biogênicas, mas não encontrou o mesmo resultado para *Staphylococcus xylosus*. MAIJALA *et al.* (1995) observaram que *Staphylococcus carnosus* não previne a formação de tiramina e  $\beta$ -feniletamina, por bactérias lácticas contaminantes durante a maturação do salame. Apesar destes dados, pouco se sabe a respeito da formação de aminas biogênicas por *Micrococcaceae* em embutidos fermentados e da relação com sua atividade proteolítica.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1-Preparo do inóculo de levedura

Foi utilizada uma cultura-mãe de *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* (CECT 12488). O processo de obtenção do inóculo obedeceu ao seguinte esquema: após a ativação em caldo BHI (Brain heart infusion) (Bio-BRÁS), transferiu-se uma alçada para 3 tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo malte adicionado de 0,1% de glicose (CMG); incubando a 28°C por 2 dias. Após esta etapa, verteu-se o conteúdo de cada tubo de ensaio em erlenmeyers contendo 90 mL de CMG, incubando-os a 28°C por 2 dias. Finalmente transferiu-se o conteúdo de cada frasco para um erlenmeyer contendo 400 mL do mesmo meio, com incubação em banho-maria a 28°C, com agitação de 60 rpm até obter-se a contagem de  $10^8$  células por mL (aproximadamente 2 dias). A quantificação do número de células do inóculo foi feita utilizando câmara de Neubauer e confirmada por plaqueamento em ágar Rosa de bengala, por inoculação em superfície e incubação a 28°C por 48 - 72h .

Para obtenção da massa celular, o meio foi centrifugado a 5000 rpm por 6 min, em centrífuga (Beckman, J2-MC, rotor JA-20), para separação da massa celular e as células foram re-suspendidas em 10 mL de água peptonada 0,1% e mantidas sob refrigeração (5 a 8 °C) até sua utilização, não mais que 18 horas posteriores, evitando assim, perda de células viáveis pelo frio.

#### 3.2 - Preparo do embutido

Para avaliação experimental, foram realizados três processamentos (repetições) em planta-piloto, conforme descrito a seguir.

O embutido foi preparado utilizando-se carne suína magra (paleta) e toucinho (papada) na proporção 60:40 (p/p). A carne de animais recém abatidos foi armazenada sob refrigeração (5 a 8 °C) por 24 h e moída em moedor (Skymesen,

PSR-10) em disco de 6 mm por duas vezes. O toucinho foi congelado e moído uma única vez em disco de 6 mm. A carne e o toucinho foram então, colocados em uma misturadeira (C.A.F, M-60) e se adicionaram os demais ingredientes e aditivos da formulação para homogeneização adequada. Os ingredientes não cárneos utilizados foram: nitrato de sódio: 0,03 g por 100 g, nitrito de sódio: 0,015 g por 100 g, pimenta do reino: 0,1 g por 100 g, noz moscada: 0,05 g por 100 g, alho em pó: 0,1 g por 100 g, páprica picante: 0,05 g por 100 g, ácido ascórbico: 540 ppm e cloreto de sódio: 2,5 g por 100 g. Nesta etapa foi adicionado o starter láctico Bactoferm T-SPX (Chr. Hansen), que contém *Staphylococcus carnosus* e *Pediococcus pentosaceus*, utilizando a dosagem recomendada pelo fabricante.

A massa obtida foi dividida em seis lotes, constituindo os tratamentos a seguir: **G**: 0,5g de glicose/ 100g de massa; **S**: 0,25 g de sacarose/ 100g de massa; **L**: 1,0 g de lactose/ 100g de massa; **GL**: 0,5 g de glicose/ 100g de massa + levedura; **SL**: 0,25 g de sacarose/ 100g de massa + levedura; **LL**: 1,0 g de lactose/ 100g de massa + levedura.

O tipo e a concentração dos açúcares utilizados foram baseados em testes preliminares in vitro.

Após preparados os tratamentos, a massa foi embutida em embutideira a vácuo (Mainca, EM-25) em tripa de celulose (Viscase), previamente hidratada, com diâmetro de 6 cm, procurando uniformizar o tamanho da amostra em 20 cm. Inicialmente os embutidos foram mantidos na câmara (B.O.D, Tecnal, TE- 391) por 6 horas à temperatura de 24°C com umidade relativa de 80% para ligeira secagem da superfície externa. As condições de fermentação adotadas em seguida foram: 24°C com umidade relativa de 85 – 90 % por 3 dias. Findo o período de fermentação, a temperatura foi gradativamente reduzida a 15°C com umidade relativa de 75 – 80% para completar a maturação e secagem do embutido, com 70 dias.

### **3.3 Análises microbiológicas do embutido**

Foram utilizados 2 embutidos de cada tratamento, realizando-se 3 diluições em duplicata. Amostras de 25 gramas, retiradas da porção central do embutido, foram diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1%, trituradas por 3 minutos em liquidificador (Super Arno) para homogeneização, e preparadas alíquotas decimais para análises microbiológicas (APHA, 1992).

As contagens microbiana (*Staphylococcus xylosum* e *Pediococcus pentosaceus*) e leveduriforme (*Debaryomyces hansenii*) foram realizadas na massa antes de embutir, ao término do período de fermentação (dia 7), ao longo da maturação (dias 14, 28, 42) e após o embutido atingir aproximadamente 30% de perda de peso em relação ao peso inicial (dia 70). O desenvolvimento do starter láctico foi observado, por contagem em ágar APT (Micromed), pelo método de pour-plate e incubação a 35°C durante 48h. A contagem de leveduras foi realizada em ágar Rosa de bengala (Oxoid), por inoculação em superfície e incubação a 28°C durante 48-72h.

### **3.4 - Análises físico-químicas do embutido**

#### **3.4.1 – Perda de Peso**

Para acompanhamento do processo de secagem, por perda de peso, foram utilizadas 5 amostras de cada tratamento, selecionadas aleatoriamente no início do processamento e acompanhadas durante a fermentação e maturação. Foram realizadas pesagens periódicas, diariamente nos 7 primeiros dias e a cada 7 dias após este período, até a obtenção do produto final (MENDONÇA, 2000).

#### **3.4.2 - Determinação do pH**

O pH foi determinado ao longo do processo de fermentação e maturação, utilizando-se eletrodo de penetração (Mettler Toledo, InLab 427) acoplado ao pHmetro (Mettler Toledo). Foram selecionados aleatoriamente, dois embutidos de cada tratamento no início do processo. Utilizaram-se dois pontos de amostragem em cada embutido.

#### **3.4.3 - Determinação da umidade**

Para determinação do teor de umidade final do embutido, foram retiradas amostras de 5 gramas, que foram trituradas e homogeneizadas. As amostras foram colocadas em cápsulas de porcelana previamente secas em estufa a 105°C por 1 hora, resfriadas em dessecador por 30 minutos e pesadas em balança analítica. As cápsulas contendo as amostras foram colocadas em estufa a 105°C durante 18 horas, resfriadas em dessecador por 30 minutos e pesadas, repetindo-se o processo até peso constante (KOLAR, 1992).

O teor de umidade foi obtido utilizando-se a seguinte equação:  $(100 \times P) / P'$ , onde P= perda de massa e P'= massa da amostra. O resultado foi expresso em g por 100g.

#### **3.4.4 - Determinação da atividade de água**

A determinação da atividade de água no embutido pronto foi realizada em aparelho Aqua-Lab (CX2T Pullman). Foram utilizados 3 embutidos de cada tratamento, dos quais foram retiradas 3 fatias de aproximadamente 0,5 cm e colocadas em câmara hermeticamente fechada. O valor da atividade de água foi obtido após o equilíbrio (MURPHY *et al.*, 2003).

#### **3.4.5 - Determinação da acidez álcool-solúvel**

Para determinação da acidez foram retiradas amostras de 5 gramas do embutido homogeneizado e da carne suína utilizada. Triturou-se as amostras em liquidificador doméstico (Super Arno) e transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com álcool etílico 95% previamente neutralizado com NaOH 1% e fenolftaleína como indicador. O balão foi agitado vigorosamente por algumas vezes e deixado em repouso por 24 horas. Após este repouso completou-se novamente o volume. O conteúdo do balão foi filtrado para erlenmeyer de 250 mL. Foram retirados 20 mL do filtrado, com auxílio de pipeta volumétrica, e adicionadas 2 gotas de fenolftaleína. Procedeu-se a titulação com hidróxido de sódio 0,1N até o aparecimento de coloração rósea, sendo o resultado expresso em mg/ 100g e amostra e todo ácido considerado como ácido láctico (GOMES *et al.*, 2003).

#### **3.4.6 - Determinação da cor**

A cor final dos embutidos foi observada no sistema Cie LAB, pela leitura direta de reflectância das coordenadas  $L^*a^*b^*$ , em espectrofotômetro Color Quest II (Hunter lab, Model) calibrado com as placas de referência branca (X = 81,12, Y= 85,99 e Z= 91,03) e cinza (X = 49,90, Y= 53,15 e Z= 55,05). Todas as leituras foram armazenadas em um computador, contendo o Software Universal conectado ao espectrofotômetro. Foram utilizados dois embutidos de cada tratamento, sendo retiradas 3 fatias de aproximadamente 0,5 cm de cada embutido e realizadas 6 leituras em cada conjunto de fatias (MURPHY *et al.*, 2003).



As médias dos valores L\*(luminosidade), a\*(intensidade de vermelho a verde) e b\*(intensidade de amarelo a azul) foram calculadas a partir das leituras. Usando os dados obtidos, calculou-se o ângulo de tonalidade (h), pela equação  $h = \arctang(b/a)$  e a saturação (c), a partir da equação  $c = (a^2 + b^2)^{1/2}$ .

### **3.5 - Detecção e quantificação de aminas biogênicas nos embutidos**

As amostras foram analisadas para detecção e quantificação das seguintes aminas: histamina, serotonina, agmatina, espermidina, espermina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e tiramina.

#### **- Preparo das soluções estoque I:**

Para preparo das soluções estoques foram pesadas: 17,56 mg de sulfato de agmatina, 17,13 mg de dihidrocloreto de cadaverina; 16,57 mg de dihidrocloreto de histamina, 13,00 mg de dihidrocloreto  $\beta$ -feniletilamina, 18,33 mg de dihidrocloreto de putrescina, 21,99 mg de hidrocloreto de serotonina, 17,53 mg de trihidrocloreto de espermidina, 17,21 mg de tetrahidrocloreto de espermina, 10,00 mg de triptamina e 10,00 mg de tiramina. Cada uma destas aminas foi solubilizada em 10,0 mL de ácido clorídrico 0,1 N para obtenção de soluções estoque com concentração de 1 mg/ mL.

#### **- Preparo da solução estoque II:**

Foi retirado 1,0 mL de cada solução estoque I e colocados em um tubo de centrífuga graduado de 10,0 mL, completando-se o volume com HCL 0,1 N obtendo-se uma solução com concentração de 100  $\mu$ g/mL da cada amina utilizada.

#### **- Preparo da solução estoque III:**

Foi retirado 1,0 mL da solução estoque II e colocada em balão volumétrico de 10,0 mL, tendo o volume completado com ácido clorídrico 0,1 N. Foi obtida uma solução com cada uma das aminas nas concentrações de 10  $\mu$ g/ mL.

#### **- Preparo da solução de trabalho:**

Foi transferida uma alíquota de 4 mL da solução estoque III para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com ácido clorídrico 0,1 N.

#### **- Preparo das amostras**

Os embutidos foram triturados em processador e foram retiradas 3 amostras de aproximadamente 5,0 g. As amostras foram colocadas em tubos de polipropileno de 50 mL e foram adicionados 7 mL de ácido tricloracético (TCA) 5% e procedeu-se a agitação das amostras em agitador orbital a 250 rpm por 10 minutos. As amostras

foram centrifugadas (Centrífuga Juan CR3i) a 10.000 g a 4°C por 20 minutos, e o sobrenadante filtrado em papel de filtro qualitativo e recolhido em proveta de 25 mL. Todo este procedimento foi repetido por mais duas vezes utilizando-se 7,0 e 6,0 mL de TCA 5%, respectivamente. O volume final do filtrado foi anotado e transferido para frasco de polietileno e mantido sob congelamento para posterior análise.

As amostras foram filtradas antes de serem injetadas no cromatógrafo, em membrana (13mm de diâmetro e 0,45µm de tamanho de poro) tipo HAWP (Millipore Corp., Milford, MA, EUA) (VALE e GLÓRIA, 1997).

### **Separação e quantificação das aminas**

As aminas foram separadas, identificadas e quantificadas através do método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa, por pareamento de íons. Para tal operação utilizou-se um sistema composto de: cromatógrafo (Shimadzu modelo LC-10 AD) com câmara de mistura a baixa pressão; conjunto automático de lavagem de pistão; injetor automático (Shimadzu Corporation, modelo SIL-10 AD VP) coluna µBondapak C<sub>18</sub> de fase reversa, 30cm x 3,9 mm, 10 µm (Waters, Milford, MA, EUA); pré coluna µBondapak C<sub>18</sub> (Waters, Milford, MA, EUA); detector espectrofluométrico (Shimadzu Corporation, modelo RF-551) a 340 nm de excitação e 445 nm de emissão; unidade de controle CBM-10 AD conectada a um microcomputador (SILVA e GLÓRIA, 2002).

- As fases móveis foram: solução A - solução tampão contendo acetato de sódio 0,2 M e octanosulfonato de sódio 15 mM e pH ajustado em 4,9 com a adição de ácido acético glacial e solução B- acetonitrila. As fases móveis foram filtradas em membrana (47 mm de diâmetro e 0,46 µm de tamanho de poro) tipo HAWP para solução aquosa e tipo HAWP para solvente orgânico (Millipore Corp., Milford, MA, EUA) (SILVA e GLÓRIA, 2002). Foi utilizado um gradiente de eluição tempo (min) - % B: 1 - 11, 13 - 11, 19 - 26, 24 - 11, 55 - 11 , com fluxo de 0,8 mL/min com temperatura ambiente controlada em 21± 1 °C.

Para identificação instalou-se uma câmara de mistura (volume morto zero) entre a saída da coluna e o detector e conectou-se um tubo de teflon de 2,0 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro (mantido sob proteção a luz) entre a câmara de mistura e o detector. A quantificação das aminas foi realizada após a derivação pós-coluna. A solução derivante foi preparada diariamente e mantida sob abrigo da luz,

com a dissolução de 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultra-pura, obtida pelo sistema milli-Q (Millipore, São Paulo, SP) e pH ajustado em 10,5 - 11,0 com a adição de hidróxido de potássio. Foram adicionados a esta solução 1,5 mL de Brij-35 (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1,5 mL de mercaptoetanol (Merck Darmstadt, Alemanha) e 0,2 g de o-ftaladeído (Sigma, Saint-Louis, MO, EUA) dissolvido em 3 mL de metanol. Esta solução foi filtrada em membrana (47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro) tipo HAWP para solução aquosa e tipo HAWP para solvente orgânico (Millipore Corp). A solução derivante foi levada à câmara de mistura através de bomba (Shimadzu Corporation, LC-10) com fluxo de 0,4 mL/min (VALE e GLÓRIA, 1997).

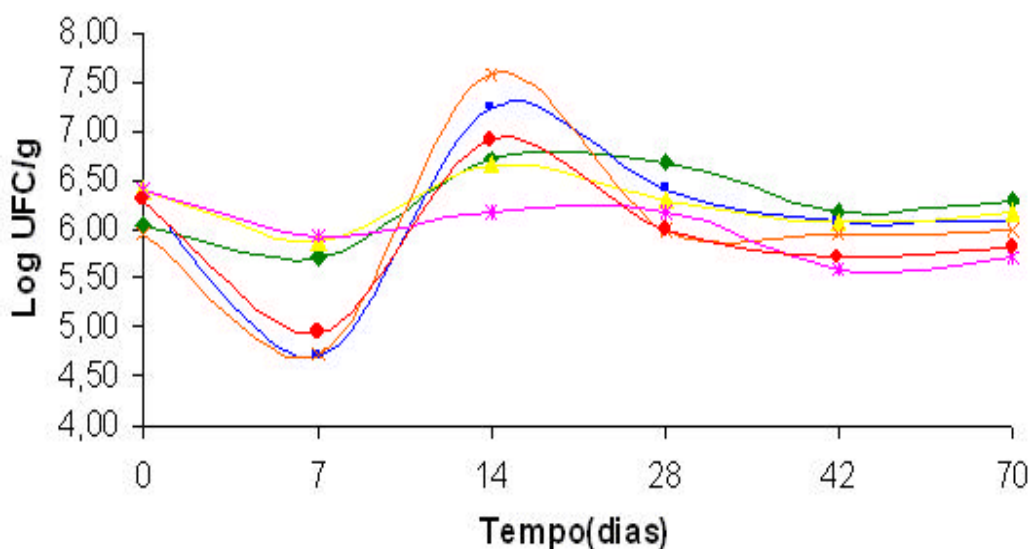
A diferenciação e conseqüente identificação das aminas bioativas foi baseada nos tempos de retenção das aminas nas soluções padrões utilizadas. A confirmação do resultado foi realizada pela adição de quantidade conhecida da solução padrão da possível amina encontrada à amostra.

A concentração das aminas nas amostras foi determinada pela relação da área do pico da amina quantificada na amostra com a área da amina correspondente em curva padrão contendo as dez aminas. Os teores de aminas foram expressos em mg por 100 g de amostra.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Análises microbiológicas do embutido

A figura 4 mostra a evolução da microbiota láctica presente no embutido.



**Figura 4** - Evolução da microbiota bacteriana, *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus carnosus* presente nos embutidos elaborados com glicose, lactose e sacarose e adicionados ou não de *Debaryomyces hansenii*, durante os 70 dias de processamento. (Tratamentos: ◆ 0,5 % Glicose, ■ 0,5 % Glicose e *D. hansenii*, ▲ 0,25 % Sacarose, ✱ 0,25 % Sacarose e *D. hansenii*, ✱ 1,0 % Lactose, ● 1,0 % Lactose e *D. hansenii*)

Os resultados indicam que no período compreendido entre o preparo do embutido (dia 0) e a primeira semana do processamento (dia 7) há uma adaptação da microbiota às novas condições que se estabelecem: presença de sal, perda de umidade, abaixamento de pH, entre outros, de tal forma que observa-se um decréscimo na contagem bacteriana, principalmente para os tratamentos inoculados com levedura, *Debaryomyces hansenii*. Esta inibição provavelmente se dá por competição pelos nutrientes uma vez que existe um maior número de

microrganismos presentes no embutido. Outra provável explicação para este fato seria a redução da taxa de crescimento de *Pediococcus pentosaceus* a temperaturas em torno de 20 °C, conforme demonstrado por BLICKSTAD e MOLIN (1981).

Nos dias posteriores, observa-se uma retomada do crescimento bacteriano em todos os tratamentos, incluindo os inoculados com leveduras, nos quais a contagem foi superior aos demais. Nesta etapa do processamento, acredita-se que as bactérias já haviam se adaptado às condições existentes. Este período corresponde ao auge do processo de fermentação, onde a microbiota metaboliza o açúcar adicionado à ácido láctico. Como resultado deste metabolismo, ocorre abaixamento do pH do meio e esta alteração das condições do meio, beneficia o crescimento desta microbiota.

Após o 14º dia, já na etapa de maturação, observa-se uma redução seguida de estabilização da contagem bacteriana. De forma geral, pode-se observar que a contagem final da microbiota bacteriana não foi afetada pela presença de levedura e nem pela adição de diferentes açúcares, uma vez que em todos os tratamentos a contagem estabilizou em torno de  $10^6$  Log UFC/g.

A utilização de diferentes açúcares afeta parâmetros importantes durante a elaboração do embutido, pois altera desigualmente a taxa de fermentação dos microrganismos presentes, influenciando, conseqüentemente, a produção de ácidos e levando à ocorrência de reações químicas diferenciadas, como: formação da cor, pH, textura, entre outros.

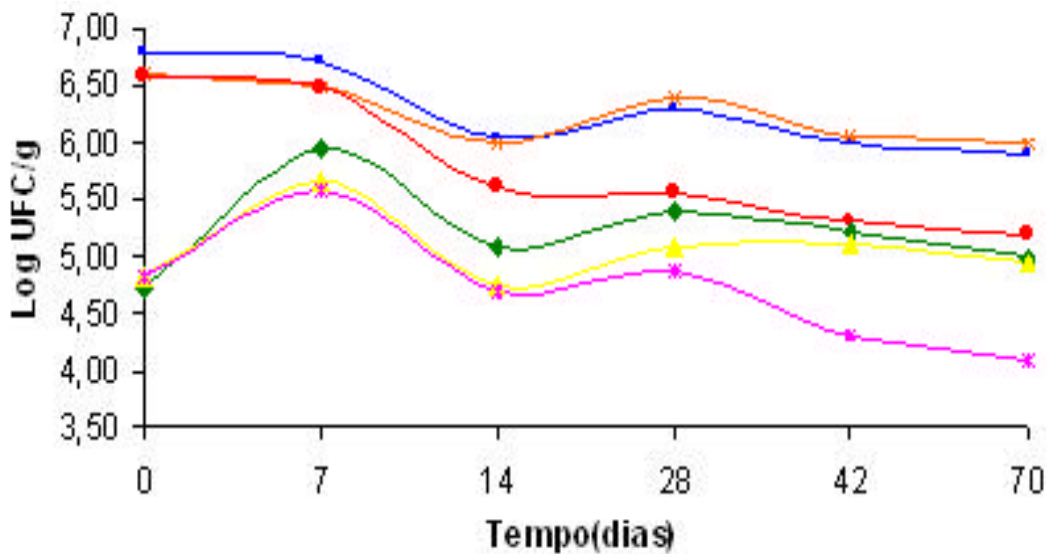
A utilização de carboidratos solúveis por bactérias lácticas e, conseqüentemente, a geração de energia e a produção de ácidos láctico e acético são largamente influenciadas pela associação com leveduras e variam de acordo com o tipo de açúcar. Os resultados obtidos são contraditórios, dada a complexidade do ecossistema (SUIHKO e MAKINEN, 1984).

SORENSEN E JAKOBSEN (1997) mostraram, em experimento *in vitro*, que a adição de 1% de glicose ao substrato não teve efeito positivo no crescimento de *S. xylosus*; pelo contrário, provocou pequena redução na contagem em condições ótimas de crescimento. Este resultado, é similar ao resultado obtidos neste estudo, apesar de se haver utilizado nível de 0,5% de glicose, pois observa-se que não houve grandes diferenças na contagem final, uma vez que independentemente do tipo de açúcar utilizado, a contagem final esteve dentro do mesmo ciclo logarítmico.

## - Leveduras

A figura 5 apresenta a evolução do número de leveduras no embutido ao longo do processamento. Observa-se que nos embutidos não inoculados com *D. hansenii*, a contagem inicial está em torno de  $10^4$  Log UFC/g. Este valor representa a contagem da microbiota leveduriforme natural da carne, bem como a oriunda de condimentos e do ambiente. Quanto aos tratamentos inoculados, observa-se uma contagem inicial em torno de  $10^6$  Log UFC/g, o que era esperado, levando-se em consideração o tamanho do inóculo utilizado.

DILLON e BOARD (1991) e DILLON (1998) estudaram a origem dos diferentes gêneros de leveduras encontrados em produtos cárneos e mostraram que a rota de contaminação começa no campo, passa por abatedouros e chega à planta de processamento.



**Figura 5** - Evolução da microbiota leveduriforme, *Debaryomyces hansenii*, presente nos embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose e adicionados ou não de levedura, durante os 70 dias de processamento. (Tratamentos: ◆ 0,5 % Glicose, ■ 0,5 % Glicose e *D. hansenii*, ▲ 0,25 % Sacarose, ✖ 0,25 % Sacarose e *D. hansenii*, ✱ 1,0 % Lactose, ● 1,0 % Lactose e *D. hansenii*)

MENDONÇA (2000), em estudo com embutidos secos fermentados, observou tendência contínua de queda na contagem de *Debaryomyces hansenii* inoculada aos embutidos, durante todo o processamento, provavelmente devido ao comportamento diferenciado do starter usado como inóculo, composto por 4 diferentes espécies bacterianas, as quais provavelmente exerceram algum tipo de interferência no crescimento das leveduras. Este resultado quando comparado com

os dados obtidos no presente estudo sugere que os microrganismos que compõem o starter bacteriano inoculado ao produto possam exercer alguma influência sobre o desenvolvimento das leveduras.

Para os tratamentos SL e GL a contagem aos 14 dias de processamento havia reduzido ligeiramente de 6,60/6,81 para 6,00/6,04 respectivamente, permanecendo neste patamar até o final do processamento.

Para o tratamento LL houve uma redução gradativa ao longo do processamento, sendo a contagem final de 5,18 Log UFC/g. A redução da contagem do número de leveduras foi maior em presença deste açúcar do que em presença de qualquer dos outros açúcares adicionados, isto pode ser explicado pois segundo BARNETT *et al.* (1990), *Debaryomyces hansenii* não fermenta lactose e seu crescimento em presença de dito açúcar, é variável.

Esta redução do número de leveduras pode ser explicada por fatores ambientais que influenciam seu desenvolvimento. A temperatura ótima de crescimento das leveduras está em torno de 25-30°C (DEAK e BEUCHAT, 1996) e uma vez que o processo de maturação e secagem foi realizado a 15°C, houve um desfavorecimento de seu desenvolvimento.

Outro fator importante é a atividade de água. As leveduras toleram baixas atividades de água, mas esta tolerância está fortemente relacionada à composição do meio de crescimento. Ao longo da secagem, ocorre um aumento na concentração de cloreto de sódio a valores superiores a 3% na massa, podendo chegar a 6 - 8% dependendo do processo de secagem (JESSEN, 1995). TOKUOKA *et al.* (1991) demonstraram que poucas leveduras conseguem crescer em meios com  $A_w < 0,88$ , na presença de cloreto de sódio. Resultados semelhantes foram demonstrados por ECK *et al.* (1993) segundo estes autores, as leveduras são mais tolerantes a concentrações elevadas de glicose do que de sal, em um mesmo valor de  $A_w$ .

A competição por nutrientes com a microbiota bacteriana é outro fator que desfavorece o crescimento das leveduras, pois as bactérias lácticas apresentam crescimento mais rápido e maior capacidade de adaptação (DEAK e BEUCHAT, 1996).

Para os embutidos não inoculados com levedura, foi observado um aumento na contagem inicial até o 7º dia. Nesta etapa ainda há um favorecimento do crescimento pelas condições ambientais da massa. Após o período de fermentação, foi observada uma redução desta contagem nestes tratamentos, em diferentes níveis,

dependendo do açúcar utilizado. O comportamento leveduriforme encontrado neste estudo coincide com aquele reportado por SAMELIS *et. al* (1994), que estudaram a população leveduriforme autóctona em salame grego fermentado e seco e com o estudo realizado por AYHAN *et al.*(1999) que observaram um aumento da microbiota leveduriforme seguido de uma redução na fase final de maturação, a valores próximos da contagem inicial em um embutido fermentado típico da Turquia.

MAIJALA *et al.* (1995a), encontraram contagens inferiores aos encontrados neste trabalho para a microbiota leveduriforme autóctona presente na carne, aproximadamente 2 Log UFC/g, porém o comportamento desta microbiota foi similar.

A lactose foi o açúcar que mais desfavoreceu o crescimento das leveduras, apresentando maior redução da contagem final. Para sacarose e glicose, após o crescimento observado até o 7º dia, podemos observar uma ligeira redução no número de células viáveis, porém a contagem final ficou próxima à contagem inicial.

De modo geral, este estudo mostra que não houve diferença no efeito da adição de sacarose e glicose, sobre o crescimento de leveduras autóctonas presentes na massa do embutido.

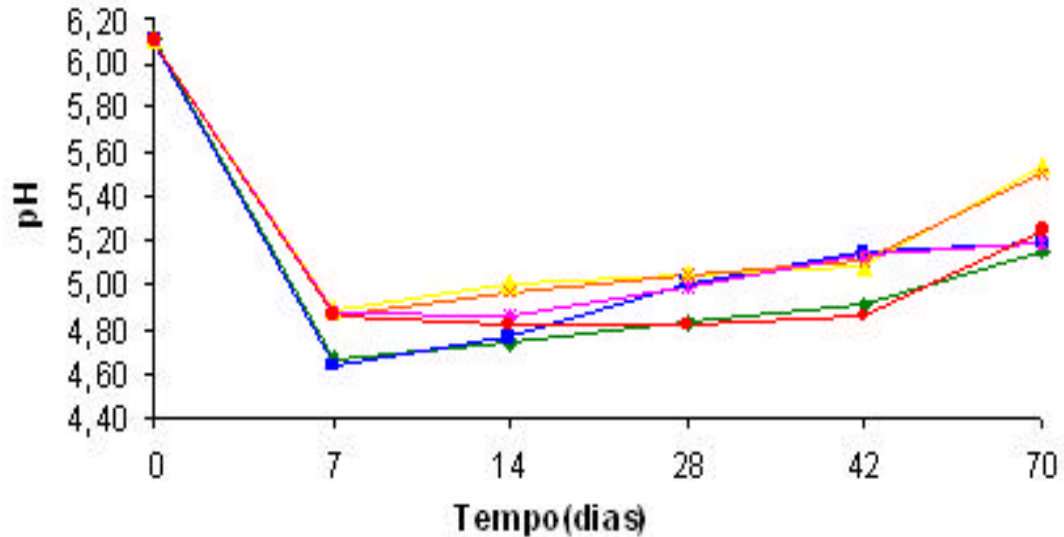
## **4.2- Análises físico-químicas do embutido**

### **4.2.1 – Determinação do pH**

Na figura 6, pode-se observar o comportamento do pH nos embutidos, durante todo o processamento.

O pH inicial da mistura de carne mais toucinho, utilizado na elaboração do embutido foi 6,11. Nos diferentes tratamentos este pH variou ao longo da fermentação e maturação, resultando em produtos cujos valores finais de pH variaram de 5,15 a 5,54. Estes valores são semelhantes a valores encontrados em diferentes estudos (TERRA *et al.*, 1987; RAO, 1997; CACCIOPPOLI, 2002). MAIJALA *et al.*(1995) em seu estudo, também encontraram comportamento semelhante para o decréscimo do pH durante processamento.





**Figura 6** – Comportamento do pH ao longo dos 70 dias de processamento nos embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose e adicionados ou não de *Debaromyces hansenii*. —●— 0,5% Glicose, —■— 0,5% Glicose e *D. hansenii*, —▲— 0,25% Sacarose, —\*— 0,25% Sacarose e *D. hansenii*, —◆— 1,0% Lactose, —●— 1,0% Lactose e *D. hansenii*.

Pela figura 6, pode-se observar que a adição do inóculo de levedura não parece ter efeito no pH final dos embutidos. Segundo diversos autores (LUCKE, 1988; MARCHESINI *et al.*, 1992; SAMELIS *et al.*, 1994; COOK, 1995) é de se esperar que o pH final dos embutidos seja mais elevado como consequência do metabolismo do ácido láctico pela microbiota leveduriforme, presente.

Outra explicação para a elevação do pH nesta etapa é dada por VARNAM e SUTHERLAND (1995), que estabeleceu que tal elevação não pode ser atribuída nem à produção de amônia, nem ao metabolismo de lactato, sendo causado pelo aumento da concentração de substâncias tamponantes resultantes da secagem, além de um aumento no grau de dissociação de eletrólitos. Segundo BOVER-CID *et al.* (1999) a elevação do pH pode também estar associada à proteólise.

Com relação à adição de diferentes açúcares na elaboração dos embutidos, pode-se observar diferenças no pH ao longo do processamento. Para glicose, pode-se observar uma maior queda de pH, de 6,15 a 4,63 (GL) e 4,67 (G), nos 7 primeiros dias, período este correspondente à fermentação, quando comparado à sacarose e lactose. Logo após este período ocorreu uma elevação gradual do pH até o final do processo, quando o pH final se estabilizou em 5,15 (G) e 5,19 (GL).

Nos embutidos adicionados de lactose após o abaixamento inicial do pH a 4,88, observa-se uma elevação lenta e gradual do pH até o valor de 5,2 ao final do processamento. Tal comportamento pode ser observado no embutido elaborado com e sem adição de levedura.

Os embutidos elaborados com ou sem levedura, mas adicionados de sacarose, apresentaram comportamento semelhante para pH. Houve um decréscimo de pH a 4,8 até o 7º dia de processamento e posteriormente observa-se um aumento gradual, atingindo 5,51 (SL) e 5,54 (S) ao final do processamento.

Comparado aos demais açúcares, a sacarose foi a açúcar que promoveu o embutido com maior pH final, enquanto glicose e lactose promoveram embutidos com pH's muito próximos.

As modificações no valor de pH nos embutidos fermentados são extremamente importantes, pois influenciam diretamente a secagem e o desenvolvimento dos microrganismos responsáveis pela maturação do embutido (BACUS, 1986; MORENO, 1979). Diferentes faixas de pH são encontradas para os embutidos nos diversos estudos realizados e isto se deve as diversas variáveis que interferem no processamento deste tipo de produto.

Não existe um consenso do valor ideal de pH para embutidos cárneos fermentados. Este valor tem que apresentar condições para o desenvolvimento das propriedades sensoriais do produto, visando a segurança microbiológica e as preferências do mercado consumidor.

#### **4.2.2 – Controle do processo de secagem mediante medidas de perda de peso, umidade e atividade de água finais**

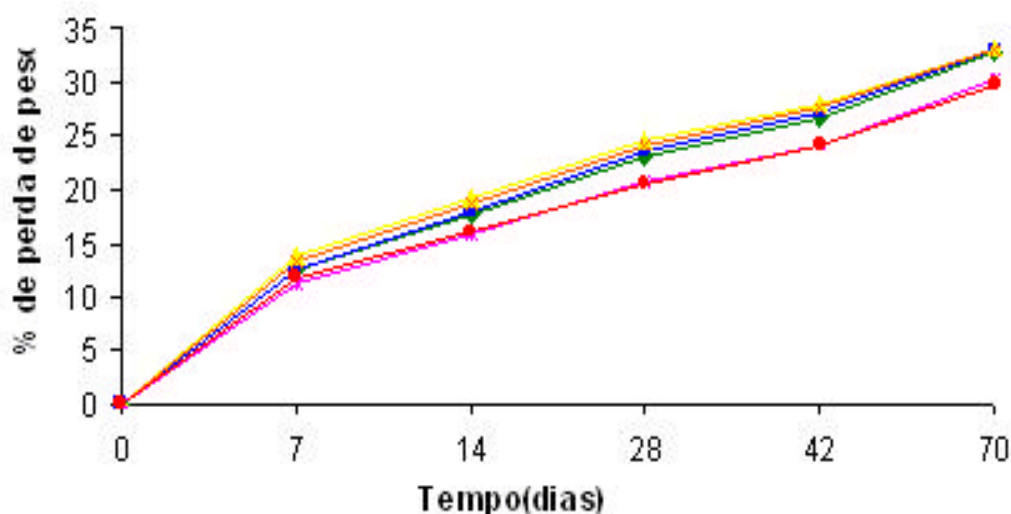
O acompanhamento do processo de secagem, mediante controle da perda de peso, foi realizado durante 70 dias. Como se pode observar na figura 7, não houve diferença no padrão de secagem entre os diferentes tratamentos ao longo da fermentação e maturação. Pode-se verificar um comportamento semelhante entre os tratamentos, independentemente do inóculo de *Debaryomyces hansenii* adicionado. Com relação aos diferentes açúcares adicionados pode-se perceber uma discreta diferença entre o uso de lactose e os demais açúcares: glicose e sacarose. Para lactose pode-se observar menor perda de peso e conseqüentemente maior teor de umidade final. Porém, como os embutidos apresentaram valores muito próximos tanto para a perda de peso quanto para a umidade final do embutido, pode-se

concluir que a adição de diferentes açúcares não afetou as características do produto final com relação a estes parâmetros.

Segundo esta perda de peso, todos os embutidos seriam classificados, após 70 dias como secos já que a perda de peso foi superior a 30% (LUCKE, 1985), ressaltando que para os embutidos elaborados com glicose e sacarose, a perda de peso em torno de 30% foi alcançada em 55 dias. MAIJALA *et al.* (1995a) encontraram porcentagens de perda de peso finais semelhantes para os embutidos, estando entre 29,1 – 32,1%.

A análise da figura 7 também permite observar, em todos os tratamentos, que cerca de 1/3 da perda de peso ocorre já nos primeiros 7 dias de processamento, o que está de acordo com dados apresentados na literatura (SAMELIS *et al.*, 1993; ROSSELLO *et al.*, 1995, MENDONÇA, 2000) e se deve à queda do pH durante a fase de fermentação, até o ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares da carne, e gera uma queda na capacidade de retenção de água. O restante da perda de peso ocorre na fase de maturação e se deve à troca de vapor d'água entre o embutido e o ambiente de câmaras de secagem (MORENO, 1979).

Em geral, a perda de peso no início da secagem tem valores máximos, pois existe maior diferença entre a tensão de vapor d'água dos embutidos e do ambiente (MORENO, 1979).



**Figura 7** – Porcentagem de perda de peso dos embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose e adicionados ou não de *Debaryomyces hansenii*, durante os 70 dias de processamento. (Tratamentos: ◆ 0,5% Glicose, ■ 0,5% Glicose e *D. hansenii*, ▲ 0,25% Sacarose, ◆ 0,25% Sacarose e *D. hansenii*, ■ 1,0% Lactose, ◆ 1,0% Lactose e *D. hansenii*.)

No quadro 6 estão apresentados os teores médios de umidade final dos embutidos em cada tratamento. Em comparação a outros trabalhos (BEILKEN *et al.*, 1990; KOLAR 1992; CHASCO *et al.*, 1993; CACCIOPPOLI, 2002) os teores de umidade encontrados neste estudo estão bem abaixo dos descritos, mesmo no que diz respeito à legislação vigente (BRASIL, 2000).

**Quadro 6** – Teores médios de umidade, após 70 dias de processamento, dos embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose e adicionados ou não de *Debaryomyces hansenii*.

Tratamentos	Umidade (g/100 g)
Glicose	20,61
Glicose + levedura	19,83
Sacarose	20,77
Sacarose + levedura	20,92
Lactose	22,08
Lactose + levedura	22,27

O controle da perda de peso e os valores de umidade final dos embutidos nos permitem avaliar que o processo de secagem ocorreu de forma satisfatória no que diz respeito à perda de água. Porém, em termos comerciais, os embutidos apresentam perdas superiores às necessárias, o que representaria, grandes prejuízos financeiros. Portanto, o processo poderia ter sido interrompido antes do tempo estipulado.

Tanto os resultados de perda de peso, quanto os de umidade final não foram influenciados pela presença do inóculo de *D. hansenii* em nenhum dos tratamentos avaliados.

Os valores obtidos na determinação da atividade de água do produto acabado são mostrados no quadro 7. Os valores de  $A_w$ , variaram de 0,679 a 0,739, o que está abaixo dos valores encontrados em outros estudos (CHASCO, 1993 e CACCIOPPOLI, 2002). CACCIOPPOLI (2002) analisando diversos tipos de embutidos encontrou valores de  $A_w$  que variam de 0,786 a 0,966. Estes valores estão abaixo do requerido pela legislação que é de 0,90 a 0,92 dependendo do tipo de salame.

**Quadro 7** – Valores médios da atividade de água, após 70 dias de processamento, dos embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose e adicionados ou não de *Debaryomyces hansenii*.

Tratamentos	Atividade de água (Aw)
Glicose	0,679
Glicose + levedura	0,709
Sacarose	0,739
Sacarose + levedura	0,732
Lactose	0,715
Lactose + levedura	0,702

Como o processo de secagem foi mais prolongado que o desejado, este fato refletiu sobre a atividade de água final do produto que se mostrou bastante baixa. As leveduras de modo geral, são mais tolerantes a baixas atividades de água que as bactérias, podendo crescer em ambientes cujos valores de Aw se aproximam de 0,62. Além disso, valores mínimos de Aw para o crescimento microbiano são influenciados pela natureza do soluto existente em solução, pela temperatura e outros fatores ecológicos existentes no meio de crescimento (DEAK e BEUCHAT, 1996). A adição de *Debaryomyces hansenii* não exerceu influência nos valores finais de Aw nos embutidos.

O cloreto de sódio, considerado bom redutor da atividade de água, foi utilizado em proporções iguais em todos os tratamentos, não podendo, portanto, ocasionar diferenças nos valores de Aw. Porém os açúcares foram adicionados diferentemente quanto à proporção e o tipo, sendo esperado uma possível influência nos valores finais da atividade de água, o que, não ocorreu como pode ser visto no Quadro 7 não ocorreu.

#### **4.2.3 – Acidez álcool-solúvel**

O quadro 8 mostra os valores da acidez titulável nos produtos finais.

Análise da acidez titulável determina a quantidade total de ácidos presentes na amostra e tem maior relação com o flavor do que o pH (NIELSEN, 1998).

Pode-se observar que o inóculo bacteriano produziu maior quantidade de ácido a partir da fermentação da lactose, seguida da sacarose e glicose. Esses dados

contradizem os resultados de HA-LA BIOTEC (1991), que mostra que com adição de glicose se percebe maior e mais rápida formação de ácido.

**Quadro 8** – Valores médios da acidez titulável, após 70 dias de processamento, para os embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose e adicionados ou não de *Debaryomyces hansenii*.

Tratamentos	Acidez (mg/100g amostra)
Glicose	2,13
Glicose + levedura	2,55
Sacarose	2,55
Sacarose + levedura	3,18
Lactose	2,73
Lactose + levedura	2,76

Quando houve adição do inóculo de levedura, a quantidade de ácido produzida a partir da sacarose e de glicose foi maior, na ordem citada, do que, nos embutidos elaborados sem a adição desta.. A hidrólise da sacarose por leveduras libera glicose e frutose, que são utilizados mais rapidamente pelas bactérias lácticas que a sacarose (LUCKE e HECHELMANN, 1987). As leveduras hidrolisam a sacarose aproximadamente 200 vezes mais rapidamente do que as hexoses liberadas (GOBBETTI, 1998; NASCIMENTO, 2001).

Com relação à lactose, pode-se observar que a acidez titulável no produto final não foi afetada pela presença ou não do inóculo de levedura. Este era um resultado previsível, uma vez que *Debaryomyces hansenii* não fermenta a lactose. Na elaboração dos diferentes salames, a lactose vem sendo utilizada com muita ênfase, face ao seu lento desdobramento e a conseqüente suavidade do pH final do salame, tendo ainda como características desejáveis o preço mais baixo e o sabor menos adocicado (HOLLEY *et al.*, 1988; TERRA, 2003).

#### 4.2.4 – Características da cor

Estudos realizados por LEISTNER e BEM (1970); ROSSMANITH *et al.*, (1972) e CORETT (1973; 1977) afirmam que o uso de *Debaryomyces hansenii*

influencia positivamente no flavor e na cor dos embutidos. Todavia, não existem suficientes dados na literatura que comprovem instrumentalmente tal afirmativa.

O quadro 9 mostra os valores de L\*, a\*, b\*, c\* e h\* encontrados para os embutidos prontos.

**Quadro 9-** Valores de L\*, a\*, b\*, h\* e c\*, após 70 dias de processamento, para os embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose, adicionados ou não de *Debaryomyces hansenii*.

Tratamento	Parâmetros de Cor				
	L*	a*	b*	h*	c*
Glicose	48,70	7,97	12,22	0,99	14,58
Glicose + levedura	46,97	7,53	13,44	1,06	15,41
Sacarose	51,10	7,09	14,27	1,11	15,94
Sacarose + levedura	49,48	7,80	14,34	1,07	16,32
Lactose	51,06	6,35	13,70	1,14	15,10
Lactose + levedura	49,43	7,57	13,80	1,07	15,74

Com relação à luminosidade (L\*), podemos observar que os menores valores foram encontrados nos embutidos elaborados com glicose em ambos os tratamentos que utilizaram este açúcar, com e sem adição de levedura. Os valores encontrados para os valores de L\* nos embutidos elaborados com sacarose e lactose, com ou sem adição de inóculo de *D. hansenii*, apresentaram valores bastante similares, ligeiramente superiores aos valores para glicose, adicionado ou não de levedura.

Comportamento similar pode ser observado para os valores de a\*. A adição do inóculo de levedura parece afetar mais intensamente na intensidade da cor vermelha quando se adiciona lactose e sacarose. A adição do inóculo de levedura em presença de glicose altera os valores de a\*, porém esta alteração é menos intensa do que quando a levedura está em presenças dos demais açúcares avaliados.

Em geral, embutidos com baixo teor de gordura e alto teor de água apresentam valores elevados para a\* e reduzidos para L\* (HAND *et al.*, 1987; CLAUS *et al.*, 1989). Outros autores encontraram que quanto mais baixo o teor de proteína, menor o valor de a\* (BLOUKAS *et al.*, 1993; CARBALLO *et al.*, 1995). Eles explicam tal fato pela diluição da mioglobina em consequência da redução do conteúdo protéico.

Os elevados valores de  $b^*$  encontrado neste estudo pode ser em parte, atribuído à presença de carotenóides provenientes da páprica, um tipo de pimenta utilizada na formulação de embutidos (ANSORENA *et al.*, 1997). GOROSPE *et al.* (1986) mostraram que os sais de nitrito reduzem a intensidade e estabilidade da cor da páprica, descolorindo-a de vermelho a amarelo em baixos valores de pH.

Para  $h^*$ , foram encontrados valores que variaram de 0,99 a 1,14 mostrando que os embutidos analisados têm tonalidade semelhante e que não houve efeito da adição de diferentes açúcares e da presença de *D. hansenii*, neste parâmetro.

Para  $c^*$ , foram encontrados valores que variaram de 14,58 a 16,32, observou-se que todos os embutidos apresentavam-se no mesmo quadrante, não havendo diferenças na saturação de cor em todos os tratamentos, comparando os açúcares utilizados e a adição de *Debaryomyces hansenii*.

Pôde-se observar que a adição de levedura, em todos os tratamentos a saturação ( $c^*$ ) foi aumentada e a luminosidade ( $L^*$ ) foi reduzida. Tal fato pode ser devido à habilidade de *D. hansenii* de consumir oxigênio do meio, evitando assim a oxidação do pigmento a oximioglobina, que apresenta menor  $c^*$  e maior  $L^*$ , quando comparado à mioglobina, que parece ser o pigmento predominante no embutido fermentado adicionado de levedura.

#### **4.2.5 - Teores de aminas bioativas**

A figura 8 mostra os teores totais de aminas bioativas em mg/ 100 g, encontradas em cada tratamento, ao final do processamento. Os teores de aminas encontrados variaram de 36,92 (LL) a 79,70 (SL) mg/ 100 g. Esses valores são superiores aos encontrados por CACCIOPPOLI (2002), cujas análises mostraram valores entre 10,67 e 53,27 mg/100g para diferentes tipos de salames encontrados no mercado consumidor de Belo Horizonte.

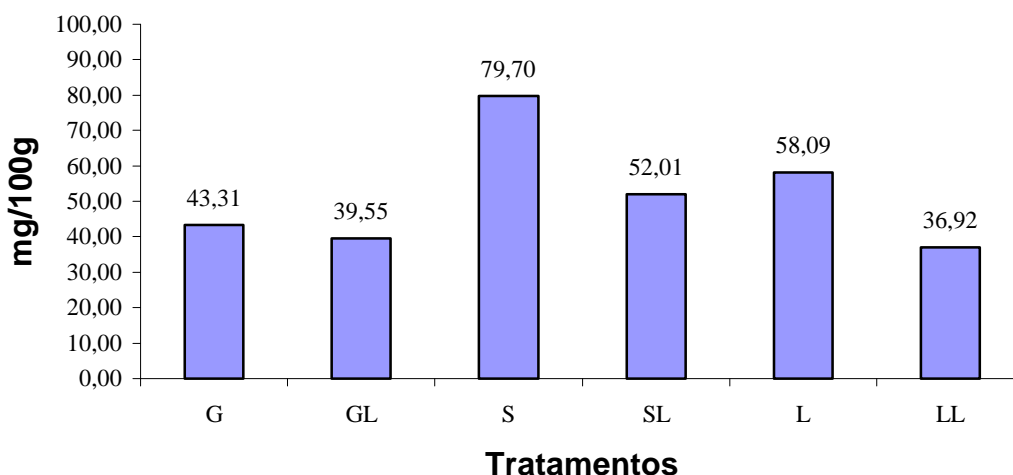
Por outro lado, HERNANDEZ-JOVER *et al.* (1997) avaliaram produtos maturados espanhóis e verificaram que 40% deles apresentavam níveis de aminas superiores a 30 mg/ 100 g.

A quantidade e o tipo de aminas biogênicas encontradas na carne e em outros alimentos, dependem de diversos fatores, tais como, sua origem e natureza, condições e etapas de processamento e da microbiota presente (HALÁSZ *et al.*, 1994). Durante o processo de manufatura de embutido, as etapas de fermentação, maturação e cura favorecem a formação de aminas, através do crescimento



microbiano, proteólise, que libera aminoácidos precursores no meio e decréscimo do pH, que favorece a atividade descarboxilase microbiana (BOVER-CID *et al.*, 1999).

O *S. carnosus* adicionado é proteolítico (BOVER-CID *et al.*, 1999) e tem potencial para a formação de aminas biogênicas (STRAUB *et al.*, 1999), assim sendo, a adição do starter pode ter favorecido a formação e acúmulo de aminas nos embutidos.



**Figura 8** – Teores totais de aminas em mg/ 100 g, após 70 dias de processamento, nos embutidos elaborados glicose, sacarose e lactose e adicionados ou não de *Debaryomyces hansenii*. G: 0,5% Glicose, GL: 0,5% Glicose e *D. hansenii*, S: 0,25% Sacarose, SL: 0,25% Sacarose e *D. hansenii*, L: 1,0% Lactose, LL: 1,0% Lactose e *D. hansenii*.

Pode-se observar pela figura 8 uma diferença nos teores de aminas entre os tratamentos com diferentes açúcares, da mesma forma que com relação a presença ou ausência do inóculo de levedura. Para embutidos elaborados com a adição de diferentes açúcares e na ausência de levedura observa-se maior teor de aminas no embutido produzido com sacarose, seguido de lactose e glicose respectivamente. Por outro lado, a adição de ocasionou uma redução nos teores de aminas. A redução observada foi de 36,40 % para lactose, 34,70 % para sacarose e 8,70 % para glicose. Desta forma, para este estudo, podemos concluir que a adição de levedura foi benéfica na elaboração dos embutidos nos quais se utilizou sacarose e lactose como fonte de carboidrato fermentescível, quando se utilizou glicose essa redução ocorreu, mas não na mesma proporção.

A figura 9 mostra os teores das diferentes aminas nos diferentes tratamentos estudados, agrupados por tipo de açúcar. Com exceção da serotonina, todas as demais aminas pesquisadas, putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, feniletilamina, triptamina, agmatina, espermina e espermidina foram encontradas em todos os tratamentos, em diferentes quantidades.

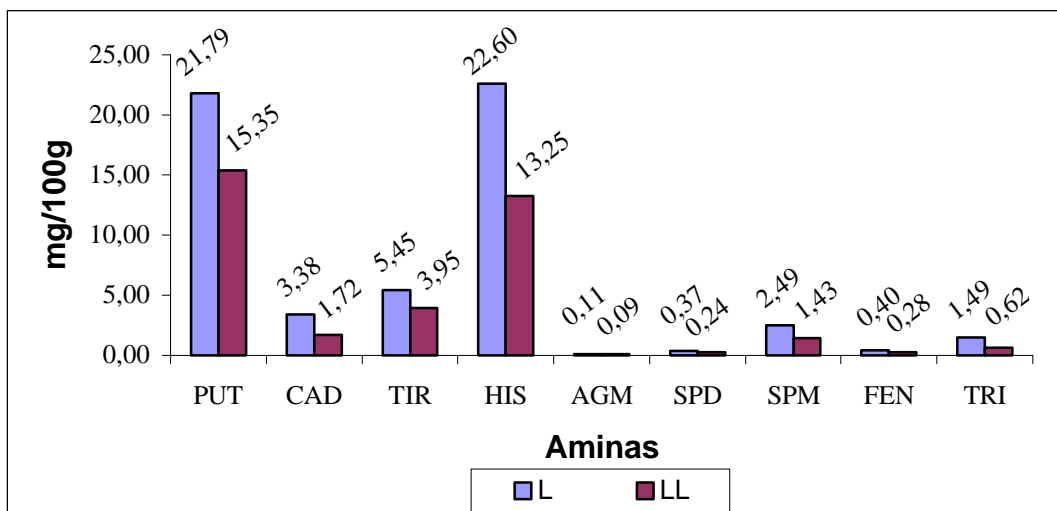
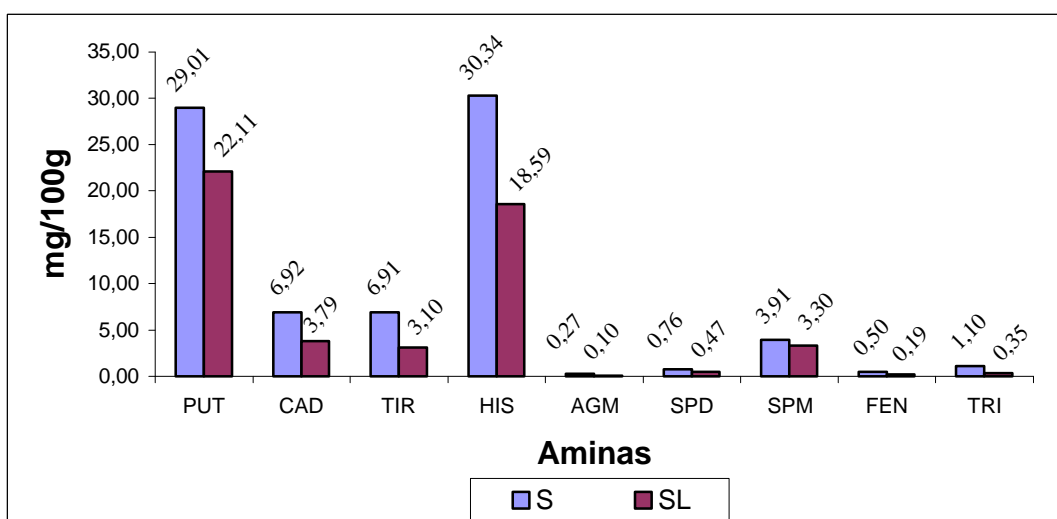
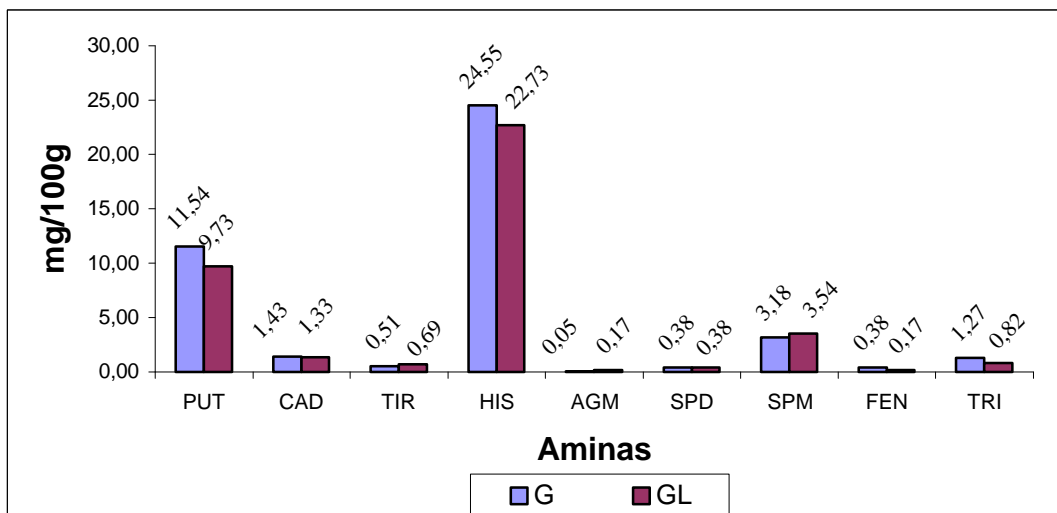
Observa-se na figura 9 que as aminas biogênicas contribuíram com maior percentual que as poliaminas (putrescina, espermina e espermidina), resultado semelhante ao encontrado por CACCIOPPOLI (2000). A presença das poliaminas em pequenas concentrações, é esperada, pois estas são encontradas no tecido animal em condições fisiológicas normais, atuando como fator de crescimento (HALÁSZ *et al.*, 1994; HERNANDEZ-JOVER *et al.*, 1997).

**Quadro 10-** Percentual de redução nos teores de aminas bioativas em embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose, após 70 dias de processamento, quando adicionados de *Debaryomyces hansenii*.

AMINAS	% Redução		
	Glicose/ Glicose+Levedura	Sacarose/ Sacarose+Levedura	Lactose/ Lactose +Levedura
Putrescina	15,75	23,77	29,56
Cadaverina	7,29	45,23	49,28
Tiramina	-34,41	55,07	27,60
Histamina	7,43	38,71	41,40
Agmatina	-231,80	63,24	15,13
Espermidina	0,08	38,74	34,92
Espermina	-11,29	15,52	42,58
Feniletilamina	56,85	61,62	30,69
Triptamina	35,36	67,68	58,38

Pode-se observar que a adição de levedura implicou numa redução (Quadro 10) nos teores de histamina, sendo mais significativa na presença de lactose, seguida de sacarose e glicose nos percentuais de 41,37%, 38,73% e 7,40%, respectivamente.

Histamina é a amina mais envolvida em casos de intoxicações alimentares, e em níveis elevados pode ocasionar diminuição da pressão sanguínea, eritema na face e pescoço, dores de cabeça e choque anafilático (TAYLOR, 1986). Muitos autores relataram a presença de elevadas concentrações de histamina, em produtos cárneos fermentados secos e maturados (SHALABY, 1993; EEROLA *et al.*, 1996; HERNANDEZ-JOVER *et al.*, 1997).



**Figura 9** – Teores de aminas bioativas, após 70 dias de processamento, nos embutidos elaborados com glicose, sacarose e lactose e adicionados ou não de *Debaryomyces hansenii*. G: 0,5% Glicose, GL: 0,5% Glicose e *D. hansenii*, S: 0,25% Sacarose, SL: 0,25% Sacarose e *D. hansenii*, L: 1,0% Lactose, LL: 1,0% Lactose e *D. hansenii*.

Segundo IENISTEA (1973), níveis de histamina de 5-10 mg por 100 g podem ocasionar diversos sintomas em indivíduos mais sensíveis, níveis de 10-100 mg/ 100g são potencialmente tóxicos e ainda, níveis acima de 100 mg por 100 g tem elevada toxicidade. De acordo com HALÁSZ *et al.*, (1994), a dose tóxica de histamina varia de indivíduo a indivíduo, dependendo do seu metabolismo.

Mesmo com a redução proporcionada pela ação das leveduras, os níveis de histamina mantiveram-se elevados e acima dos estabelecidos como tóxicos, podendo ocasionar diversos sintomas ao consumidor. Esta redução encontrada neste trabalho contradiz o concluído por MONTEL *et al.*. (1999), que encontraram que *D. hansenii* é capaz de produzir histamina.

A análise dos embutidos de cada tratamento mostrou níveis de tiramina entre 0,51 e 6,91 mg / 100 g, valores estes inferiores aos encontrados por VIDAL-CAROU *et al.*, (1990); EEROLA *et al.*,(1996); HERNANDEZ-JOVER *et al.*, (1997) e CACCIOPPOLI (2002). Além disto, estes autores encontraram valores superiores de tiramina em relação a histamina, o inverso do encontrado neste estudo.

Para os embutidos elaborados sem a adição de leveduras, observa-se que maiores índices de tiramina foram encontrados quando se adicionou sacarose, seguida da lactose e glicose, respectivamente. Porém, quando ocorreu a adição de levedura, houve uma redução de 55,07% e 27,60% desta amina nos tratamentos contendo sacarose e lactose, respectivamente. Por outro lado, em presença de glicose, observa-se um aumento da concentração de tiramina em torno de 34,41%.

Diversos autores relataram a presença de elevadas concentrações de tiramina em produtos cárneos fermentados secos (SHALABY, 1993; EEROLA *et al.*, 1996; HERNANDEZ-JOVER *et al.*, 1997).

A tiramina é a segunda amina envolvida em intoxicações alimentares (LIMA e GLÓRIA, 1999) e em níveis elevados pode ocasionar inflamação cutânea, dores de cabeça, enxaqueca, febre, vômito, transpiração e aumento da pressão sanguínea (MAIJALA e EEROLA, 1993). A dose considerada tóxica para tiramina é de 10 mg/100 g (FUZIKAWA, 1999). Neste estudo, em todos os tratamentos os níveis de tiramina encontrados estão abaixo do nível tóxico. Entretanto, quando o indivíduo faz uso de drogas inibidoras da monoaminaoxidase, a dose tóxica passa a ser de 6 mg/ 100g (FUZIKAWA *et al.*,1999). Neste caso, o embutido preparado com sacarose poderia causar intoxicação por tiramina.

Neste estudo os valores encontrados para putrescina variaram de 9,73 a 29,01 mg/100g no embutido. Esses valores são superiores aos encontrados por CACCIOPPOLI (2002) e semelhantes aos encontrados por HERNANDEZ-JOVER *et al.*, (1997). Para o embutidos elaborados apenas com a adição de diferentes açúcares, maiores teores de putrescina foram detectados nos embutidos elaborados com sacarose, seguido dos elaborados com lactose e glicose. Porém, nos embutidos adicionados de levedura, houve uma redução expressiva nos teores desta amina. Para lactose, esta redução foi de 29,56%, para sacarose de 23,77% e para glicose, 15,75%.

A presença de putrescina e cadaverina pode ocasionar o aparecimento de sabor desagradável, potencializar o efeito tóxico de tiramina e histamina (BOVERCID *et al.*, 1999).

Putrescina, cadaverina, espermina, espermidina e agmatina podem reagir com nitrito em condições ácidas propiciando a formação de nitrosaminas, potencialmente cancerígenas (LIMA e GLÓRIA, 1999), e segundo BARDOCZ (1995) a ingestão de putrescina, espermina, espermidina pode acelerar o crescimento de tumores.

Os valores encontrados para cadaverina variaram de 1,33 a 6,92 mg /100g no embutido. Estes valores são semelhantes aos encontrados por CACCIOPPOLI (2002) e HERNANDEZ-JOVER (1997). Para o embutidos elaborados apenas com a adição de diferentes açúcares, maiores teores de cadaverina foram detectados na presença de sacarose, seguido de lactose e glicose. Porém, nos embutidos adicionados de levedura, houve uma redução expressiva nos teores desta amina. Para lactose esta redução foi de 49,28%, para sacarose de 45,23% e para glicose, 7,29%.

HERNANDEZ-JOVER *et al.*, (1997) verificaram que os níveis de espermina e espermidina encontrados em produtos maturados foram menores do que na carne fresca. Já, segundo EEROLA *et al.*, (1996) não houve aumento significativo nos níveis de espermina durante a maturação de embutidos.

Foram encontrados valores de espermina que variaram de 1,43 a 3,91 mg/100g nos embutidos analisados. Estes valores são superiores aos encontrados por CACCIOPPOLI (2002), EEROLA *et al.*, (1997) e HERNANDEZ-JOVER (1997).

Considerando apenas os diferentes açúcares adicionados, podemos observar maiores teores de espermina no tratamento com sacarose, seguido por glicose e lactose. Nos embutidos adicionados de levedura, houve redução desta amina nos

percentuais de 42,58 e 15,52% para lactose e sacarose, respectivamente. Para glicose houve acréscimo de 11,29% no teor desta amina.

Para espermidina valores de 0,24 a 0,76 mg/ 100 g foram encontrados, sendo o menor teor no tratamento LL e o maior no tratamento S. Estes valores são semelhantes aos encontrados por CACCIOPPOLI (2002), EEROLA (1997) e HERNANDEZ-JOVER (1997).

Nos tratamentos, aos quais *D. hansenii* foi adicionada, observa-se uma redução de 38,74 e 34,92% para sacarose e lactose respectivamente, enquanto que para glicose o valor permaneceu inalterado.

Níveis elevados de feniletilamina e triptamina podem ocasionar dores de cabeça e aumento da pressão sanguínea e da força de contração cardíaca (HALÁSZ *et al.*, 1994).

Os valores de feniletilamina encontrados se assemelham aos encontrados por CACCIOPPOLI (2002), EEROLA *et al.*,(1997) e HERNANDEZ-JOVER (1997) e variaram de 0,17 a 0,40 mg/ 100 g sendo menor para o tratamento GL e maior para o tratamento L. Mesmo apresentando baixos teores, com a adição de levedura, estes valores foram reduzidos nas proporções de 61,62%, 56,85% e 30,69% para sacarose, glicose e lactose respectivamente. Em todos os tratamentos, os valores de feniletilamina encontrados estão abaixo do nível tóxico de 3 mg/ 100 g (HALÁSZ *et al.*,1994).

Para triptamina foram observados valores baixos, semelhantes aos encontrados por CACCIOPPOLI (2002), EEROLA (1997) e HERNANDEZ-JOVER *et al.*, (1997). Estes valores variaram entre 0,35 mg/ 100 g para SL e 1,49 mg/ 100 g para L. Os teores encontrados, quando comparamos os embutidos elaborados com diferentes açúcares, foram maiores para sacarose, glicose e lactose respectivamente. Porém, com a adição de levedura houve uma redução de 67,68%, 58,38% e 35,36% para sacarose, lactose e glicose, respectivamente.

Para agmatina foram encontrados os menores valores, entre 0,05 e 0,27 mg/100g, sendo o menor para glicose e o maior para sacarose. Estes valores são inferiores aos encontrados por BOVER-CID *et al.*, (1999) e CACCIOPPOLI (2002). Com a adição de *D. hansenii*, observa-se redução desta amina nos percentuais de 15,13 e 63,24% para lactose e sacarose, respectivamente. A adição de levedura em presença de glicose causou um incremento de 231,8 % no teor desta amina. Apesar

deste percentual parecer exagerado, o fato não é tão relevante, principalmente pela amina estar presente em pequena concentração, próximo ao limite de detecção.

De forma geral, pode-se concluir que para a utilização de sacarose nesta concentração, houve um favorecimento na formação da maioria das aminas analisadas, sendo, portanto o açúcar menos recomendado.

Quanto à adição de levedura, pode-se afirmar que seu uso como starter foi efetivo na redução do teor de aminas totais. Esta redução é dependente do açúcar utilizado e é mais efetiva para algumas aminas do que outras.

## 5. CONCLUSÕES

1. O tipo e a proporção de açúcar adicionado aos diferentes tratamentos não afetaram os parâmetros físico-químicos avaliados.
2. A lactose foi o açúcar que menos favoreceu o desenvolvimento da microbiota leveduriforme.
3. O desenvolvimento da microbiota leveduriforme foi semelhante em presença de glicose e sacarose.
4. O desenvolvimento da microbiota bacteriana analisada não foi afetado pelo tipo de açúcar utilizado.
5. A adição do inóculo de levedura aos diferentes tratamentos, não afetou os parâmetros físico-químicos avaliados.
6. O desenvolvimento da microbiota bacteriana analisada não foi afetado pelo inóculo de levedura.
7. O teor de aminas totais foi afetado pelo tipo de açúcar adicionado, sendo maior quando se utilizou sacarose, seguido de lactose e glicose, respectivamente.
8. Com a adição do inóculo de levedura houve redução nos teores de aminas totais. Todavia, estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de buscar as justificativas para tal comportamento de modo a se conhecer profundamente os aspectos do metabolismo da levedura que contribuem para tal característica.



9. Com a adição do inóculo de levedura houve redução nos teores de cada amina individualmente analisada, com exceção de tiramina e espermina.

OS RESULTADOS DESTE ESTUDO INDICAM QUE A ESTIRPE DE *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* (CECT 12488) APRESENTA POTENCIAL PARA USO COMO COADJUVANTE NO PROCESSAMENTO DE EMBUTIDOS FERMENTADOS, PRINCIPALMENTE COMO UMA ALTERNATIVA DE CONTROLE DE FORMAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUNYEWA, A. A. O.; LAING, E.; Hugo, A. e VILJOEN, B.C.. The population change of yeasts in commercial salami. **Food Microbiology**. v.17, p.429 – 438, 2000.

AGUILERA, J.M. e CHIRIFE, J. Combined Methods for the Preservation of Foods in Latin America and the CYTED-D Project. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.22, n-14, p.433-444, 1994.

AL-JALAY; B. BLACK, G e AL-KHAYANT, M. Antioxidant activity of selective spices used in fermented meat sausage. **Journal of Food Protective**. v. 50, p. 25 - 27, 1987.

ANSORENA, D; DE PEDIN, M. P.; ASTIASARÁN, L.; BELLO, J.. Color evaluation of chorizo de Pamplona, a Spanish dry fermented sausage : comparison between the Cie  $L^*a^*b^*$  and the Hunter lab system with illuminants D65 and C . **Meat Science**. v. 46, p. 313 - 318, 1997.

ARNAU, J.; MANEJA, E. e MONTFORT, J. M. Factores que influyen en la apricon de precipitados de tirosina. **Carnica 2000**. v. 48, p.106 -110, 1987.

ARNETH, W. e HEROLD, B. Determination of nitrate and nitrite in sausages alter enzymatic reduction. **Fleischwirtschaft**. v. 68, p.761 - 764, 1988.

AYHAN, K.; KOLSARICI, N.; OZKAN, G. A. The effects os a starter cultura on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. **Meat Science**. v. 53, p. 183 – 188, 1999.

BACUS, J.N. Update: meat fermentation. **Food Technology**. v. 38, n.6, p.59-63, 1984.

BACUS, J.N. Utilization of microorganisms in meat processing. **Letchworth: Research Studies Press Ltd**. John Wiley & Sons. 170 p, 1986.

BAIRD-PARKER, A.C. Organic acids. In: SILLIKER, J.H.; ELLIOTT, R.P.; BAIRD-PARKER, A.C. **Microbial Ecology of Foods**. New York; Publishing, Cap.11, p. 313-373, 1979.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol**. v.6, p.341-346, 1995.

- BARDÓCZ, S.; GRANT, G.; BROWN, D.S.; RALPH, A.; PUZSTAI, A. Polyamines in food. Implication for growth and health. **J. Nutr. Biochem.** v.4, p. 66 – 71, 1993.
- BEILKEN, S.L.; JONES, P. N. e HARRIS, P. V. Sensory and other methods for assessing salami quality. **Food Res. Quarterly.** v.50, n.2, p. 54 – 66, 1990.
- BEUCHAT, L. R. New York: Van Nostrand Reinhold. **Food and beverage mycology.** 2nd ed, p.67, 1987.
- BLICKSTAD, E. e MOLIN, G. Growth and lactic acid production of *Pediococcus pentosaceus* at different gas environment temperatures, pH value e nitrite concentrations. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.13, p. 170 – 174, 1981.
- BLOUKAS, J. G.; PANERAS, E. D. Substituting olive oil for pork backfat affects quality of low-fat frankfurters. **J. of Food Sci.** v.58 p. 705 – 709, 1993.
- BOVER-CID, S.; IZQUIERDO-PULIDO, M. e VIDAL-CAROU, M. C. Effect of proteolytic starter culture of *Staphylococcus* spp. On biogenic amine formation during ripening of dry fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** v. 46, p. 95 – 104, 1999.
- BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H.M.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **Int. J. Food Microbiol.** v.11, p. 73 – 84, 1990.
- BUCKENHTISKES, H. J. Bacterial starter cultures for fermented sausage. **Meat Focus Inter.** v.12, p. 497-500, 1994.
- BUCKENHUSKES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews.** v. 12, p. 253 – 272, 1993.
- CACCIOPPOLI, J. **Características físico-químicas e aminos bioativas em salames.** 2002. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CAPRIOTTI, A. Indagini microbiologiche sulle carni insaccate. Nota I : I lieviti. **Arch. Vet. It.** v.5, p.113 – 115, 1954.
- CARBALLO, J.; MOTA, N.; BARRETO, G.; JIMEÑEZ COLMENERO, F.. Binding properties and color of bologna sausage made with varying fat levels, protein levels and cooking temperatures. **Meat Science,** v. 41, p. 301-313, 1995.
- CESARI, E.P. La maturation du saucisson. **Academic des Sciences.** v. 168, p. 802 – 803, 1919.
- CESARI, E.P e GUILLIERMOND, A. Les levures des saucissons. **Annales de l'Institut Pasteur.** v. 34, p. 229 – 248, 1920.

CHANDLER, R. E. e MCMEEKIN, T. A. Modelling the growth response of *Staphylococcus xylosus* to changes in temperatures and glycerol concentration/water activity. **J. Appl. Bact.** v.66, p.543 – 548, 1989.

CHASCO, J.; BERIAIN, M. J.; BELLO, J. A. A study of changes in the fat content of some varieties of dry sausage during the curing process. **Meat Sci.** v.34, p.191 – 204, 1993.

CLAUS, J. R.; HUNT, M. C.; KASTNER, C. L. Effects of substituting added water for fat on the textural, sensory and processing characteristics of bologna. **J. Musc. Food.**, v.1, p.1-21,1989.

COMI, G. e CANTONI, C. I lieviti in insaccati crudi stagionati. **Ind. Alim.** v.19, p.857 – 860,1980.

COMI, G. e CANTONI, C. Presenza di lieviti nei pros ciulti crudi stagionati. **Ind. Alimentar.** v. 22, p.102 – 104, 1983.

COOK, P. E. Fungal ripening meats and meat products. **Fermented Meats**, Blackie Academic and Professional, Chapman e Hall, cap 5, p. 110- 129, 1995

CORETTI, K. Starterkulturen in der Fleischwirtschaft. **Fleischwirtschaft.** v. 57, p. 386- 394, 1977.

DEAK, T. Foodborne yeasts. **Adv. Appl. Microbiol.** v.36, p. 179 – 278,1991.

DEAK, T. e BEUCHAT, L. R. **Handbook of Food Spoilage.** NewYork, CRC Press.1996.

DEKETELAERE, A.; DEMEYER, D.; VANDEKERCKHOVE, P. e VERVAEKE, I. Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. **J. Food Sci.** v.39, p. 297-300, 1974.

DELLAGLIO, S.; CASIRAGHI, E.; POMPEI, C. Chemical, physical and sensory attributes for the characterization of Italian dry-cured sausages. **Meat Science.** v. 42, p 25 – 35, 1996.

DEMASI, T. Nonprotein nitrogen (NPN) and free aminoacids contents of dry, fermented and nonfermented sausages. **Meat Science.** v. 27, p 1 – 12, 1990.

DEMEYER, D. I. Meat fermentation as an integrate process. **New Technology for meat and meat products.** p 209– 229, 1992.

DEMEYER, D. I. Quality and safety of fermented meat products **Flair-Flow Reports F-FE.** V.169/95,p.1, 1995.

DÍAZ, T.M.L.; GONZÁLZ, C.J.; MORENO, B.; OTERO, A. Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. **Food Microbiology.** v.19, p.1-7, 2002.

- DIESTRE, A. Principales problemas de la calidad de la carne de porcino. **Alimentación, Equipos y Tecnología**. Madrid, n.7, p. 73–78, 1992.
- DILLON, V. M. Yeasts and moulds associated with meat and meat products. **The microbiology of meat and poultry**. p. 85 – 117, 1998.
- DILLON, V. M. e BOARD, R. G. Yeast associated with red meats (A review). **J. Appl. Bacteriol.** v. 71, p. 93 – 108, 1991.
- DOWELL, M. J. e BOARD, R. G. A microbiological survey of British fresh sausage. **J. Appl. Bacteriol.** v.31, p. 378 – 396, 1968.
- DYETT, E. J. e SHELLEY, D. The effect of sulphite preservative in British fresh sausage. **J. Appl. Bacteriol.** v.29, p.439, 1966.
- EEROLA, S.; MAIJALA, R.; ROIG-SAGUÊS, A. X.; SALMINEN, M.; HIRVI, T. Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant amine-positive *Lactobacillus*. **J. Food Sci.** v. 61, n. 6 p. 1243 – 1246, 1996.
- EEROLA, S.; ROIG-SAGUÊS, A. X.; LILLIBERG, L.; AALTO, H. Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**. v. 205, p. 351 – 355, 1997.
- EITENMILLER, R.R.; KOEHLER, P.E.; REAGAN, J.O. Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine decarboxylase. **J. Food Sci.** v. 43, p. 689 – 693, 1978.
- FERREIRA, V. L. P.; FERNANDES, S. V.; YOTSUYANAGI, K. The color of chicken and pork meat loaf with added cured bovine blood a evaluated by the Rab, Hunter Lab, L\*, a\*, b\* and XYZ CIE systems. **Revista Espanhola de Ciencia y Tecnología de Alimentos**. v.34, p.311-322, 1994.
- FLORES, M.; ARISTOY, M.C.; TOLDRA, F. Biogenic polyamines affect activity of aminopeptidase B and alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. **J. Food Sci.** v.61, p. 13-27, 1996.
- FREY, Werner. **Fabricacion fiable de embutidos**. Editoria ACRIBIA, S.A.1983,194 p.
- GARCIA, F.; FOX, P. F. Study of proteolysis during the processing of a dry fermented pork sausage. **Meat Science**. v. 30, p 367 – 383, 1991.
- GEHLEN, K. H.; MEISEL, C., Fischer, A.; HAMMES, W. P. Influence of the yeast *Debaromyces hansenii* on dry sausage fermentation. **Proceedings of the 37th international congress of meat science and technology**. p 871 – 878, 1991.
- GEISEN, R. Fungal starter cultures for meat foods: molecular aspects. **Trends in Food Science and Technology**. v. 4, p. 251 - 256, 1993.

GEISEN, R.; LUCKE, F.K.; KROCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. **Fleischwirtschaft**. v. 72(6), p. 894 – 898, 1992.

GLÓRIA, M. B. A .Metabólitos microbianos- Aminas Biogênicas. **Microbiologia de Alimentos: Qualidade e Segurança na produção e Consumo**, UFV, Viçosa, p.91-114, 2003

GOBBETTI, M. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. **Trends in Food Science & Technology**. v. 9, p. 267-274, 1998.

GOMES, J. C; SILVA, M. H. L; SILVA, C. O. **Análise de Alimentos**. 2ª Edição. Funarbe, 2003.p. 41 – 44, 2003.

GOROSPE, O.;SANCHEZ-MONGE, J. M.; BELLO, J. Eliminacion de interferencias en el estudio quimico del color de productos carnicos comerciales, provocados por las sustancias colorantes presentes. (A study to eliminate problems in the chemical determination of colour in commercial meat products elaborated with colorants). **Alimentaria**. v. 23, p. 25 – 32, 1986.

GRAZIA, L.; SUZZI, G.; ROMANO, P. ; GIUDICI, P. The yeasts of meat products. **Yeast** v.5, p.495 – 499, 1989.

GREER, G. G. e MURRAY, A. C. Effects of pork muscle quality on bacterial growth and retail case life. **Meat Sci**. v.24, p.61 – 72, 1988.

HA-LA BIOTEC. Fatores Determinantes da Produção de Embutidos Fermentados - Parte II. **Informativo HA-LA BIOTEC/Divisão frigoríficos**. v,1, 1991.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Sci. Technol**. 5:42-49, 1994.

HAMMES, W.P.; KNAUF, H.J. Starters in the processing of meat products. **Meat Sci**. v.36, p.155 – 168, 1994.

HAMMES, W.P. Proceedings from food ingredients - European Conference on Ingredients and Additives. **Wiesbaden**. 22 p., 1987.

HAMMES, W.P.; BANTLEON, A.; MIN, S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**. v.87, p. 165-174, 1990.

HAND, L. W., HOLLINGSWORTH, C. A., CALKINS, C. R.; MANDIGO, R. W. Effects of preblending, reduced fat and salt levels on frankfurter characteristics. **J. Food Science**. v.52, p. 1149-1151,1987.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.;IZQUIERDO-PULIDO,M. ;VECIANA-NOGUÉS, M.T; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic and Polyamine contents in meat and meat products. **J.Agric. Food Chem.**, v.45,n.6,p.2098-2102, 1997.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M. ;VECIANA-NOGUÉS, M.T; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. **Journal of Food Protection**. v.60, n.7, p.825-830, 1997 b.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M. ;VECIANA-NOGUÉS, M.T; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic sources in cooked cured shoulder pork . **J.Agric. Food Chem.**, v.44, p.3097-3101, 1996.

HIERRO, E.; DE LA HOZ, L.; ORDONEZ, A. Contribution of the microbial and meta endogenous enzymes to the free amino acid and mine contents of dry fermented sausages.**Journal of Agricult. and Food Chem.** v. 47, n. 3, p. 1156 – 1161, 1999.

HOLLEY, R.A. Prevention of surface mould growth on Italian dry sausage by natamycin and potassium sorbate. **Appl. Envirom. Microbiol.** v. 41, p. 422 – 429, 1981.

HOLLEY, R.A; JUI, P. A.; MITTMANN, M.; KWAN, P. Survival of *Staphylococcus aureus* and *S. thyphimurium* in raw ripened dry sausage formulated with mechanically-separated chicken meat. **Fleischwirtschaft**. v. 68, p. 194 – 201, 1988.

HUERTA, T.; QUENOL, A.; HERNANDEZ-HABA, J. Yeasts of dry cured hams, qualitative and quantitative aspects . **Microbiologie-Aliments-Nutrition**. v. 6, 289–294, 1988.

HUGAS, M.;GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; MONFORT, J.M. Inhibition of Listeria in dry fermented sausages by the bacterio-cinogenic Lactobacillus sake CTC494. **J. Appl. Bacteriol.** v. 79, 322– 330, 1995.

HUGAS, M. ; Monfort, J. M A.. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**. v. 59, No. 4, p. 547-554, 1997.

HUIS IN'T VELD, J.H.J.; HOSE, H.; SCHAAISMA, G.J.; SILLA, H. E SMITH, J.E. Health aspects of food biotechnology. **Processing and Quality of Foods**. v.2, 1990.

IENISTEA, C. Significance and detection of histamine in food. **The microbiology safety of food**. London: Academic Press.p. 327 – 343, 1973.

INIGO, B.; ARROYO, V.; SOMAVILLA, J. Estudio microbiologico del proceso de fabricacion de embutidos. Identificacion de lavaduras. **Rev. Agroquim. Technol. Aliment**. v.10, 406 – 410, 1970.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3° ed. Editora Acribia, 804 p., 1992.

JAY, J. M. ; MARGITIC, S. Incidence of yeast in fresh ground beef and their ratios to bacteria. **J. Food Sci**.v, 46, p.648 – 649, 1981.

- JESSEN, B. Starter culture for meat fermentations. **Fermented Meats**. Blackie Academic & Professional, Chapman e Hall, cap. 6, p. 130 – 159, 1995.
- JUVEN, B.J.; WEISSLOWICZ, H.; HAREL, S. Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic startes cultures. **Journal of Applied Bacteriology**. v.65, n.6, p.357-360, 1988.
- KATSARAS, K; BUDRAS, K. D. Microstructure os fermented sausage. **Meat Sci**. v. 31, p. 121 - 134, 1992.
- KOLAR, K. Gravimetric determination of moisture and ash in meat and meat products: NMKL interlaboratory study. **J. Food Sci**. v. 43, n. 4, p. 1245- 1247, 1978.
- KRAFT, A. A. Meat microbiology. **Muscle as food**. Ed. P. J. Bechtel, Academic Press, Orlando. p. 239- 278, 1986.
- KROCKEL, L. Bacterial fermentation of meats. **Fermented Meats**, Blackie Academic and Professional, Chapman e Hall, cap 4, p. 69- 109, 1995.
- KURTZMAN, C. P. ; FELL, J. W. The Yeasts: A Taxonomic Study. **Elsevier Science Publishers**. 4<sup>a</sup> ed, 1998.
- LAWRIE, R. The structure, composition and preservation of meat. **Fermented Meats**, Blackie Academic and Professional, Chapman e Hall, cap 1, p. 1- 38, 1995.
- LEISTNER, I.; BEM, Z. Vorkommen und Bedeutung vom Hefen bei pokelfleischwaren. **Fleischwirtschaft**. v. 50, p. 350 – 351, 1970.
- LEISTNER, L ; ECKARDT, C. Vorkommen toxinogener Penicillien bei Fleischerzeugnissen . **Fleischwirtschaft**. v. 59, p1892 – 1896, 1979.
- LEISTNER, L. Neue nitrit-verordnung der bundesrepublik Deutschland. **Fleischwirtschaft**. v. 61, p 338 – 346, 1981.
- LEISTNER, L. Food design by Hurdle Technology and HACCP. **Adalbert Raps Foundation**, 1994, 62p.
- LEISTNER, L. Stable and safe fermented sausage world-wide. **Fermented Meats**, Blackie Academic and Professional, Chapman e Hall, cap 7, p. 160- 175, 1995.
- LIEPE, H.U. Starter culture in meat production. **Biotechnology**.v. 5, p. 399 – 424, 1981.
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Bol. SBCTA** 33(1):70-79, 1999.



- LIZASCO, G.; CHASCO, J.; BERIAIN, M. J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**. v. 16, p.219 – 228, 1999.
- LLANO, D.G.; CUESTA, P. E RODRÍGUEZ, A. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. **Letters in Applied Microbiology**. v. 26, p.270 – 274, 1998.
- LOIS, A. L.; GUTIERREZ, L. M. ZUMALACARREGUI, J. M; LOPEZ, A. Changes in several constituents during the ripening of Chorizo – A Spanish dry sausage. **Meat Science**. v. 19, p. 169 - 177, 1987.
- LUCKE, F. Fermented Meat Products. **Food Research International**. v,27, n.3, p.299-307, 1994.
- LUCKE, U. Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. **Fleischwirtschaft**. v.66(10), p. 1505-1509,1986.
- LÜCKE, F. and HECHELMANN, H. Starter cultures for dry sausages and raw ham. Composition and effects. **Fleischwirtsch.** v. 67, p.307-314, 1987.
- LUCKE, F.-K. Fermented sausages. **Microbiology of Fermented Foods**. v. 2, Second Edition, Blackie Academic and Professional.p. 41 – 83, 1985.
- LUCKE, F.-K. Fermented sausages. **Wood B.J (Ed), Microbiology of fermented foods**. Elsevier, London. p. 442 – 481, 1998.
- LUCKE, F.-K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**. v. 56, p. 105 - 115, 2000.
- MAGA, J. A. Contaminant Amines in food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 10, p. 373 – 403, 1978.
- MAIJALA, R. ;EEROLA,S. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausage produce histamine and tyramine. **Meat Sci.** v. 35, p. 387 – 395, 1993.
- MAIJALA, R.; EEROLA, S.H; AHO, M.A.; HIRN, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amine in meat. **Food Prot.** v. 56, p. 125 – 129, 1995
- MAIJALA, R.; NURMI, E.; FISCHER, A. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausage. **Meat Sci.** v. 39, p. 9 – 22, 1995(a).
- MAIJALA, R.; EEROLA, S.H; AHO, M.A. e HIRN, J.A. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amine in meat. **Food Prot.** v. 56, p. 125 – 129, 1995.
- MARCHESINI, B.; BRUTTIN, A.; ROMAILLER, N.; MORETON, R.S.; STUCCHI, C. ; SOZZI, T. Microbiological events during commercial meat fermentation. **J. Appl. Bact.** v. 73, p.203 – 209, 1992.

MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUÉS, T. E HERNÁNDEZ-JOVER, T. Lês amines biogenes dans lês aliments, leur signification, leur analyse. **Fals. Exp. Chim.** v. 931, p. 119 – 140, 1995.

MASSON, F.; ECLACHEL, L.; COMPTE, T.; TALON, R. e MONTEL, M.C. Screening of microbial strains producing amines and isolated from meat products. **Proceedings os 42 nd International Congress of Meat Science and Technol.** p. 546 – 547, 1996.

McCABE, B.J. Dietary tyramine and other pressor amines in MAOI regimens: a review. **J. Am. Diet. Assoc.** 86:1059-1064, 1986.

MEISEL, C.; GEHLEN, K.H. FISCHER, A. e HAMMES, W.P. Inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* in dry sausage by *Lactobacillus curvatus*, *Micrococcus varians* and *Debaryomyces hansenii*. **Food Biotechnology.** v. 3, p. 145 – 168, 1989.

MENDONÇA, R.C.S. ***Lactobacillus plantarum e Pediococcus pentosaceus na produção de salame tipo italiano.*** 1992. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

METAXOPOULOS, J.; STRAVROPOULUS, S.; KAKOURI, A, SAMELIS, J. Yeasts isolated from traditional Greek dry salami. **Italian J. Food Sci.** v. 1, p. 25 – 32, 1996.

MIELNIK, J. ; SLINDE, E. Sausage color measured by integrating sphere reflectance spectrophotometry when whole bood or blood cured by nitrite is added to sausages. **Journal of Food Science.** v.48, p. 1723-1725, 1983.

MONTE, E.; VILLANUEVA, J. R. ; DOMINGUES, A. Fungal profiles of Spanish country-cured hams. **Int. J. Food Sci. Technol.** v.3, p.355 - 359, 1986.

MORENO, A. S. Evolucion de varias microfloras y su interdependencia con las condiciones fisico-químicas durante la maduración del salsichon. **Alimentaria.** v.100, p.39 - 56, 1979.

MURPHY, S.C; GILROY, D.; KERRY, J. F.; BUCKLEY, D. J. E KERRY, J. P. Evaluation of surimi, fat and water content in a low/no added pork sausage formulation using response surface mathodology. **Meat Science.** v.66 (3), p.689 – 701, 2004.

NAES, H.; CHRZANOSWSKA, J; NISSEN-MEYER, J. PEDERSEN, B. O. e BLOM, H. Fermentation of dry sausage- The importance of proteolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria . **Proc. 37<sup>th</sup> Int. Cong. Meat Sci. Technol.** v.2, p.914 – 917, 1991.

NASCIMENTO, J.D.. Fatores Determinantes do Rendimento de Carne Magra em Suínos: Melhoramento Genético. **Agrocere**s, 2001.

- NIELSEN, H. J. S. ; KEMMER, M. K. B. Lipolytic activity of meat starter culture. **Proc. 35<sup>th</sup> Int. Congr. Meat Sci. Technol.** p. 318 – 322, 1989.
- NYNCHAS, G. L.; DILLON, V. M. ; BOARD R, G. Glucose, the key substrate in the microbiological changes occurring in meat and certain meat products. **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 10, p. 203 – 231, 1988.
- ODA, S. H. I.; SOARES A. L. ; LARA, J. A. F.; YAMASHITA F. ; IDA E. I. ; SHIMOKOMAKI, M. Segurança e qualidade para os embutidos. **Revista Nacional da Carne.** n° 317, 2003.
- OLESEN, P. T. ; STAHNKE, L. H. The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces . **Meat Science.** v. 56, p. 357-368 , 2000.
- PAPON, M. ;TALON, R. Factors affectin growth and lipase production by meat lactobacilli strains and *brochothrix thermospacta*. **J. Appl. Bact.** v. 64, p. 107 – 115, 1988.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne.** Goiânia: Editora da UFG, 1996. 1.109 p.
- PAULSEN P.; BAUER F.; VALI, S. Biogenic amines in fermented sausages. **Fleischwirtschaft International.** v. 2, p. 27 – 31, 1997.
- PIERSON, M.; SMOOTH, L. Nitrite, nitrate alternatives and control of *Clostridium botulinum* in cured meats. **Crit. Rev.Food Sci. Nut.** v.17, p.141-187, 1987.
- PROCHASKA, J.F.; RICKE, S.C.; KEETON, J.T. Meat fermentation – Research opportunities. **Food Technology.** v.52, n.9, p.52-56, 1998.
- PUOLANNE, E. Der Einfluss von verringerten Nitrit und nitratzusätzen auf die Eigenschaften der Rohwurst. **J. Sci. Agric. Soc. Finland.** v.49, p.1-106, 1977.
- RACCACH, M; HENNINGESN, E.C. The effect of chloride salts on *Yersinia enterocolitica* in meat. **Food Microbiology.** v.14, p.431-438, 1997.
- RAMARATHNAM, N.; RUBIN, L. J. ; DIOSADY, L. L. Qualitative and quantitative at differences in uncured and cured pork. **J. Agric. Food Chem.** v.39, p.344 - 350, 1991.
- REIS, A.G.B; SOARES, G.J.D. Salame Colonial Processado com Carne Suína e Ovina. **Rev. Bras. de Agrociência.** v.2 n 2, p.115-120, 1998.
- RICE, S.I.; EITENMILLER, R.R. ; KOEHLER, P.E. Biologically active amines in food: A review. **J. Milk Food Technol.** v. 39, p. 353 – 358, 1976.
- RODEL, W.; STIEBING, A. E KROCKEL, L. Ripening parameters for traditional dry sausage with a mould covering. **Fleischwirtschaft.** v.73, p.848 - 853, 1993.

- RODRIGUEZ, J.M.; SOBRINO, O.J.; MOREIRA, W.L.; FERNANDEZ, M.F.; CINTAS, L.M.; CASAUS, P.; SANZ, B.; HERNANDEZ, P.E. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sake* strains of meat origin. **Meat Sci.** v. 38, p.17–26, 1994.
- ROSSELLO, C.; BARBAS, J. I.; BERNA, A.; LÓPEZ, N. Microbial and chemical changes in sobrasada during ripening. **Meat Sci.** v.40, p. 379 – 385, 1995.
- ROSSMANITH, E.; MINTZLA, H.J.; STRENG, B.; CHRIST, W.; LEISTNER, L. Hefen als Starterkulturen für Rohwürste. **Jahresbericht der BAFV.** v.I, p. 47 – 48, 1972.
- SAMELIS, J.; AGGELIS, G.; METAXOPOULOS, J. Lipolytic and microbial changes during the natural fermentation and ripening of Greek dry sausage. **Meat Sci.** v.35, p.371 - 385, 1993.
- SAMELIS, J.; STRAVOPOULOS, S.; KAKOURI, A. Quantification and characterization of microbial populations associated with naturally fermented Greek dry salami. **Food Microbiol.** v.11, p.447 - 460, 1994.
- SANZ, Y.; VILA, R.; TOLDRÁ, F.; FLORES, J. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology.** v.42, p.213-217, 1998.
- SCANLAN, R.A. Formation and occurrence of nitrosamines in foods. **Cancer Res.** v.43, p.2435 – 2440, 1983.
- SCHLEIFER, K. H. Gram-positive cocci. **Manual of systematic bacteriology.** v.2. Eds. P.H.A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe e J. G. Holt. Williams & Wikins. 1986.
- SCHILLINGER, ULRICH ; LUCKE, FREDERICH-KARL. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. **Fleischwirtschaft.** v.70 (11), p.1296-1299, 1990.
- SELGAS, D.; GARCIA, L.; GARCIA DE FERNANDO, G. E ORDONEZ, J.A. Lipolytic and proteolytic activity of micrococci isolated from dry fermented sausages. **Fleischwirtschaft.** v. 73, p. 1164 – 1166, 1993.
- SEMENOVA, M. G.; ANTIPOVA A. S.; BELYAKOVA; L. E.. Food protein interactions in sugar solutions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science.** V.7, p.438-444, 2002.
- SHALABY, A.R. Survey on biogenic amines in Egyptian foods: sausage. **J. Sci. Food Agric.**, v 62, n.3, p.291-293, 1993.
- SHELEF, L.A.; NAGLIK, O.A.; BOGEN, D.W. Sensitivity of some common foodborne bacteria to the spices sage, rosemary and allspice. **Journal Food Science.** v.45, n.4, p.1042-1044, 1980.

- SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **Int. J. Food Microb.** v.29:p.213-231, 1996.
- SILVA, C. M. G.; GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at  $4 \pm 1$  °C and in chicken-based meat products. **Food Chem.** v.78, p.241-248, 2002.
- SMITH, T. A. **Ann. Rev Plant Physiol.** v. 36,p. 117 – 200,1985.
- SMITH, J. L. ; PALUMBO, S. A. Use of starter cultures in meats. **J. Food Protect.** v. 46,p. 997 – 1006,1983.
- SORENSEN, B. B.; JAKOBSEN, M. The combined effects of temperature, pH and NaCl on growth of *Debaryomyces hansenii* analysed by flow cytometric and predictive microbiology. **Int. J. Food Microbiol.** v. 34, p. 209 – 220,1997.
- STIEBING, A.; RODEL, W. Influence of relative humidity on the ripening of dry sausage. **Fleischwirtschaft.** v. 68, p.1287 - 1291, 1988.
- STILES, M.E. Potencial for biological control of agents of foodborne disease. **Food Research International.** v.27, n.3, p.245-250, 1994.
- STRATTON, J.E.; HUTKINS, R.W.; TAYLOR, S.L. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **J. Food Protect.** 54(6):460-470, 1991.
- STRAUB, B.W.; KICHERER, M.; SCHILCHER, S.M.; HAMMES, W.P. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. **Z. Lebensm. Unters. Forsch.** 201:79-82, 1995.
- SUIHKO, M. L. ; MAKINEN, V. Tolerance of acetate, propionate and sorbate by *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulopsis holmii* . **Food Microbiol.** v.1, p. 105 – 110, 1984.
- TAKAHASHI, G. Ingredientes e suas funções na fabricação de produtos cárneos. **Obra coletiva. Ed. Unicamp – Campinas.** 18 p, 1980.
- TAYLOR, S.L. Histamine poisoning associated with fish, cheese and other foods. **Genebra:World health organization.** p. 1- 45, 1985.
- TAYLOR, S.L. Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. **Crit. Rev. Toxicol.** 17(2):91-128, 1986.
- TERRA, N. N.; FROZZI, V.; STOLFFLS, I.; STEFEMEL, V.; VALENTE, C. R. Efeitos secundários do glutamato monossódico no salame tipo italiano. **Revista Nacional da Carne.**v. 11, n. 127, p. 12 - 13, 1987.
- TERRA, N. N. A Qualidade da Carne Suína e Sua Industrialização. **1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína.** p. 147 - 151, 2000.

- TERRA, N. N. Particularidades na Fabricação de Salame. **Revista Nacional da Carne**. n°317, 2003.
- TETLOW, A. L. ; HOOVER, D. G. Fermentation products from carbohydrates metabolism in *Pediococcus pentosaceus* PC39. **J. Food Protect.** v. 51 (10), p. 804 – 806, 1988b.
- TOKUOKA, K; ISHITANI, T. Minimum water activities for the growth of yeasts isolated from high-sugar foods. **J. Gen Appl. Microbiol.** v. 37, p. 111 – 119, 1991.
- TOWNSED, W. E. ; DAVIS, C. E. Effect of hanging position of some properties of dry sausage. **Journal of Food Science.** v. 37, p. 633, 1972.
- VALE, S. R; GLÓRIA, M. B. A. Determination of biogenic amines in cheese. **J. AOAC Int.** n.4, p.521 – 526, 1997.
- VARNAM, A.H. ; SUTHERLAND, J.P. **Meat and Meat Products. Technology, chemistry and Microbiology.** Editora Chapman & Hall. v.3, 1995.
- VIDAL-CAROU, M.C.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARTIN-MORRO, M.C. MARINE-FONT, A. Histamine and tyramine in meta products: relationship with meta spoilage. **Food Chem.** v..37, p. 239 – 249, 1990.
- WALKER, H. W. Spoilage of food by yeast. **Food Technol.** v.31, p.57 – 65, 1977.
- WIRTH, F. Restricting and dispensing with curing agents in meat products. **Fleischwirtschaft.** v.71 (9), p.1051 - 1054, 1991.
- ZAIKA, L.L.; KISSINGER, J.C. Effects of some spices on acid production by starter cultures. **Journal of Food Science.** v.49, n.1, p.5-9, 1984.
- ZEUTHEN, P. Historical aspects of meat fermentations. **Fermented Meats.** p. 53 - 68, 1995.

## **APÊNDICE**

# **1-REGULAMENTO TÉCNICO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE SALAME**

## **1. Alcance**

### 1.1. Objetivo

Fixar a identidade e as características mínimas de qualidade que deverá obedecer o produto cárneo denominado Salame. 1.2. Âmbito de Aplicação. O presente regulamento refere-se ao produto Salame, destinado ao comércio nacional e/ou internacional.

## **2. Descrição**

### 2.1. Definição

Entende-se por Salame, o produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou bovina, adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado.

Nota 1: A presença de "mofos" característicos, é consequência natural do seu processo tecnológico de fabricação.

### 2.2. Classificação

Trata-se de um produto cru, curado, fermentado, maturado e dessecado.

### 2.3. Designação (Denominação de Venda)

O produto será designado de Salame, seguido ou não das expressões que caracterizem sua origem ou processo de obtenção.

Exemplos:

Salame Tipo Italiano

Salame Tipo Milano

Salame Tipo Hamburgues

Salame Tipo Friolano

Salame Tipo Calabres

Salame Tipo Alemão

Salaminho

Outros

## **3. Referências**

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Normas ABNT - Plano de amostragem e procedimento na inspeção por atributos - 03.011, NBR 5426, jan/1985.

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis: of the AOAC international., 42.1.03, 1995.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04/09/97. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas



- Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Métodos Analíticos Físico-químicos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes – Sal e Salmoura - SDA. Instrução Normativa nº 20, de 21/07/99, publicada no Diário Oficial da União, de 09/09/99. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999.
  - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal . Instrução Normativa nº 42, de 20/12/99. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999.
  - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos. Portaria nº 371, de 04/09/97. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997.
  - BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº 63.526, de 04/11/68. Brasília: Ministério da Agricultura, 1968.
  - BRASIL. Ministério da Agricultura. RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29/03/52. Brasília: Ministério da Agricultura, 1952.
  - BRASIL. Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo. Portaria INMETRO nº 88, de 24/05/96. Brasília: INMETRO, 1996.
  - BRASIL. Ministério da Justiça. Código de Proteção e Defesa do Consumidor. Lei nº 8.078, de 11/09/90. Brasília: Ministério da Justiça, Departamento de Proteção e Defesa do Consumidor, 1997.
  - BRASIL. Ministério da Saúde. Princípios Gerais para Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. Portaria nº 451, de 19/09/97, publicada no Diário Oficial da União, de 02/07/98. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.
  - BRASIL. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico de Atribuição de Função de Aditivos, e seus Limites Máximos de Uso para a Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos. Portaria nº 1002/1004, de 11/12/98. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.
  - EUROPEAN COMMUNITIES. European Parliament and Council Directive nº 95/2/EC, of 20 february 1995. Official Journal of the European Communities. Nº L61/1, 18/03/95.
  - FAO/OMS. Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion. Organizacion Mundial de la Salud. Codex Alimentarius. Carne y Productos Carnicos. 2ª. Ed, v. 10, Roma, 1994.
  - ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Compendium of methods for microbiological examination of foods. ICMSF, 1992.
  - ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Micoorganisms in foods 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto Press, 1986.
  - MERCOSUL. Mercado Comum do Sul. Resolução 91/94. BRASIL. Ministério da Indústria, do Comércio e do Turismo. Portaria INMETRO nº 74, de 25/05/95. Brasília: INMETRO, 1995.
  - MERCOSUL. Mercado Comum do Sul. Resolução do Grupo Mercado Comum (GMC) 36/93. Mercosul, 1993.

#### **4. Composição e Requisitos**

##### 4.1. Composição

#### 4.1.1. Ingredientes Obrigatórios

Carne Suína (mínimo de 60%, exceto para o salame tipo hamburguês, onde o teor permitido é de no mínimo 50%)

Toucinho. Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio.

#### 4.1.2. Ingredientes Opcionais

Carne Bovina

Leite em pó

Açúcares

Maltodextrinas

Proteínas lácteas

Aditivos intencionais

Vinho

Condimentos, aromas e especiarias

Substâncias glazeantes (revestimento externo)

#### 4.1.3. Coadjuvantes de tecnologia

Cultivos iniciadores (starters)

### 4.2. Requisitos

#### 4.2.1. Características Sensoriais

4.2.1.1. Textura: Característica

4.2.1.2. Cor: Característica

4.2.1.3. Sabor: Característico

4.2.1.4. Odor: Característico

#### 4.2.2. Características Físico-Químicas

De acordo com a designação do produto em seus respectivos regulamentos técnicos.

Valores máximos e mínimos aceitáveis:

Atividade de água -  $A_w$  (máx.) - 0,92

Umidade (máx.) - 40 %

Gordura (máx.) - 35 %

Proteína (mín.) - 20 %

Carboidratos totais (máx.) - 1,5 %

### 4.3. Acondicionamento

O produto deverá ser embalado com materiais adequados para as condições de armazenamento e que lhe confirmem uma proteção apropriada.

## **5. Aditivos e Coadjuvantes de Tecnologia/Elaboração**

De acordo com a legislação vigente

## **6. Contaminantes**

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo regulamento vigente.

## **7. Higiene**

### 7.1. Considerações Gerais

7.1.1. As práticas de higiene para a elaboração do produto estarão de acordo com o estabelecido no "Código Internacional Recomendado de Práticas de Higiene para os Produtos Cárnicos Elaborados" (Ref. CAC/RCP 13 - 1976 (rev. 1, 1985)) do "Código Internacional Recomendado de Práticas de Higiene para a Carne Fresca" (CAC/RCP 11 - 1976 (rev. 1, 1993)), do "Código Internacional Recomendado de Práticas - Princípios Gerais de Higiene dos Alimentos" (Ref.: CAC/RCP 1 - 1969 (rev. 2 - 1985)) - Ref. Codex Alimentarius, vol. 10, 1994.

7.1.2. Toda a carne usada para elaboração de Salames deverá ter sido submetida aos processos de inspeção prescritos no RIISPOA - "Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal" - Decreto nº 30.691, de 29/03/1952.

### 7.2. Critérios Macroscópicos/Microscópicos

O produto não deverá conter materiais estranhos ao processo de industrialização.

### 7.3. Critérios Microbiológicos

Aplica-se a legislação vigente.

## **8. Pesos e Medidas**

Aplica-se o regulamento vigente.

## **9. Rotulagem**

Aplica-se o regulamento vigente (Portaria nº 371, de 04/09/97- Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos - Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasil).

## **10. Métodos de Análises**

Instrução Normativa nº 20, de 21/07/99 publicada no Diário Oficial da União, de 09/09/99- Métodos Analíticos para Controle de Produtos Cárneos e seus Ingredientes - Métodos Físico-Químicos - SDA - Ministério da Agricultura e Abastecimento, Brasil.  
- AOAC Official Methods of Analysis, 42.1.03 ,1995.

## **11. Amostragem**

Seguem-se os procedimentos recomendados na norma vigente.