

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**ELABORAÇÃO DE SALAME DE PEIXE CONTENDO PRÓPOLIS
VERMELHA E CULTURA *STARTER*: CARACTERÍSTICAS
MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS**

JÉSSICA FERREIRA MAFRA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
DEZEMBRO - 2019**

**ELABORAÇÃO DE SALAME DE PEIXE CONTENDO PRÓPOLIS
VERMELHA E CULTURA *STARTER*: CARACTERÍSTICAS
MICROBIOLÓGICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAIS**

JÉSSICA FERREIRA MAFRA

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Norma Suely Evangelista-Barreto

Co-orientador: Floricea Magalhães Araújo

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

DEZEMBRO - 2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
JÉSSICA FERREIRA MAFRA**

Prof. Dr^a. Norma Suely Evangelista-Barreto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientador)

Prof. Dr. Carlos Pasqualin Cavalheiro
Universidade Federal da Bahia

Dr^a. Cátia Ionara Santos Lucas
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
DEZEMBRO - 2019**

À minha mãe, Solange Ferreira.

Ninguém um dia recebeu mais amor e apoio incondicional do que eu tive de você.

AGRADECIMENTOS

À professora Norma pela orientação e paciência durante seus imprescindíveis ensinamentos em todo o curso de mestrado.

A UFRB pela oportunidade de realização do curso.

À CAPES pelo apoio a pesquisa e concessão da bolsa.

À professora Floricea pela co-orientação e pelos valiosos ensinamentos.

Às doutoras Marisa e Aline pelas contribuições a minha pesquisa, mas acima de tudo pelo apoio e amizade.

Ao técnico Fabrício pela disponibilidade, paciência, confiança, apoio e ensinamentos, fundamentais para a realização desse trabalho.

À todos os professores, técnicos e funcionários que colaboraram com meus estudos e trabalho.

À minha amiga e parceira de laboratório, Alexsandra Iarlen, pelo companheirismo e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do laboratório, Milena e Thiago, pela ajuda, amizade e por tornar meus dias mais divertidos e alegres.

Aos alunos de PIBIC e PIBIC júnior, Carol, André, Vanessa, Deise, Renata, Catarine, Lara e Evelyn, pela disponibilidade, apoio, carinho e amizade.

À minha família, especialmente aos meus pais, Rubens e Solange, pelo incentivo, sabedoria e por acreditar no meu trabalho e em minhas convicções.

À Paulo Lucas pelo apoio, amor e companheirismo.

Às minhas amigas, Rebeca e Sarah, que apesar da distância foram constante fonte de motivação e incentivo ao longo do curso.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho.

Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Compostos identificados no extrato hidroalcoólico da própolis vermelha por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas..... 50
- Tabela 2.** Conteúdo fenólico e atividade antioxidante do extrato da própolis vermelha, proveniente do estado da Bahia, Brasil.....53
- Tabela 3.** Coeficiente de correlação de Pearson do conteúdo total de fenóis, flavonóides e atividade antioxidante (DPPH e ABTS).....55
- Tabela 4.** Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha.....56

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Média dos valores dos halos de inibição (mm) da cultura *starter* frente a patógenos alimentares.....74

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Ingredientes utilizados em cada formulação do salame de tilápia.....86
- Tabela 2.** Notas médias dos atributos sensoriais obtidos com as formulações de salame de tilápia.90
- Tabela 3.** Análises microbiológicas ($\log \text{UFC mL}^{-1}$) dos diferentes salames de peixe formulados durante o período de maturação.....93
- Tabela 4.** Valores médios da determinação de cor nos salames formulados F1: salame contendo BHT; F3: salame contendo 0,4% de EHPV; e F5: salame sem BHT e EHPV, por meio dos parâmetros L^* (luminosidade), a^* (índice vermelho) e b^* (índice amarelo).....101

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Cromatograma da análise do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....52

CAPÍTULO 2

Figura 1. Crescimento da cultura *starter* comercial em baixos valores de pH por 2 horas. Médias acompanhadas pela mesma letra, no mesmo dia, não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.75

Figura 2. Crescimento da cultura *starter* comercial em diferentes concentrações de sais biliares por 2 horas. Médias acompanhadas pela mesma letra, no mesmo dia, não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.76

CAPÍTULO 3

Figura 1. Porcentagem de notas inferiores a 4 (rejeição), iguais a 4 (indiferença) e superiores a 4 (aceitação) para impressão global (escala hedônica). F1: salame contendo BHT; F2: salame contendo 0,2% de EHPV; F3: salame contendo 0,4% de EHPV e F4: salame contendo 0,6% de EHPV.....92

Figura 2. Valores médios de pH (A), atividade de água (A_w) (B), oxidação lipídica (C) e bases voláteis totais (D) nas três formulações de salame de tilápia durante o período de maturação. F1: salame contendo BHT; F3: salame contendo 0,4% de EHPV; e F5: salame sem BHT e EHPV.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a*	Índice vermelho
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico
AlCl₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
Aw	Atividade de água
b*	Índice amarelo
BAM	Bacteriological Analytical Manual
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBM	Concentração bactericida mínima
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CO₂	Gás carbônico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EHPV	Extrato hidroalcoólico da própolis vermelha
eq	Equivalente
F1	Formulação um
F2	Formulação dois
F3	Formulação três
F4	Formulação quatro
F5	Formulação cinco
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	Gramas
h	Horas
H₂S	Ácido sulfídrico

HCl	Ácido clorídrico
He	Hélio
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e estatística
IC50	Concentração necessária para eliminar 50% dos radicais livres
K	Coeficiente constante
kg	Kilogramas
kPa	Kilopascal
L*	Luminosidade
log	Logaritmo
M	Mols
m/z	Massa/carga
máx	Máximo
MDA	Malonaldeído
mg	Miligramas
mín	Mínimo
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimols
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
N-BVT	Bases voláteis totais
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	Nanômetros
NMP	Número Mais Provável
nº	Número
°C	Graus Celsius
p	Probabilidade de significância
PG	Propil galato
pH	Potencial hidrogeniônico

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
spp	Espécies
t	Toneladas
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Butil hidroquinona
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta
Who	World Health Organization
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrômetros
µM	Micromols

ÍNDICE

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVO GERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
REVISÃO DE LITERATURA	18
Produção e consumo de pescado.....	18
Embutidos de peixe na cadeia de processamento do pescado	19
Embutido tipo salame.....	20
Processo de fabricação de salame.....	22
Alterações no processamento e armazenamento de embutidos.....	23
Deterioração biológica.....	23
Deterioração química.....	26
Os riscos dos conservantes sintéticos.....	28
Conservantes naturais.....	30
Uso de probióticos em embutidos.....	32
REFERÊNCIAS	35

CAPÍTULO 1

Estudo químico e biológico do extrato de própolis vermelha: potencial aplicação na conservação de alimentos.....	43
--	----

CAPÍTULO 2

Caracterização probiótica de uma cultura <i>starter</i> comercial.....	67
--	----

CAPÍTULO 3

Caracterização físico-química, sensorial e microbiológica de salame de tilápia contendo própolis vermelha	82
---	----

RESUMO

MAFRA, J. F. Elaboração de salame de peixe contendo própolis vermelha e cultura *starter*: características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais

Os consumidores têm buscado, cada vez mais, ingerir alimentos saudáveis e livres de conservantes. Desse modo, este trabalho teve como objetivo investigar as propriedades químicas e biológicas do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV), verificar se a cultura *starter* comercial usada na fermentação de embutidos cárneos apresenta características probióticas, e avaliar o efeito do EHPV nas características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas do salame de tilápia. O EHPV foi avaliado quanto ao conteúdo fenólico, atividade antioxidante, identificação de compostos químicos e atividade antibacteriana frente a patógenos alimentares. A cultura *starter* comercial foi avaliada quanto a resistência a diferentes, capacidade antagônica usando patógenos alimentares, resistência a baixos valores de pH e sais biliares; produção de gás, cápsula e capacidade de acidificação; crescimento em diferentes valores de pH e temperaturas e sensibilidade a diferentes concentrações de sais de cura. Também foi observado o efeito inibitório do EHPV sobre a cultura *starter*. Foi realizada análise sensorial do salame de tilápia com BHT e com diferentes concentrações do EHPV (0,2, 0,4 e 0,6%). Nos tratamentos controles, positivo (BHT) e negativo, e na formulação contendo EHPV escolhida sensorialmente foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas após 0, 2, 4, 8 e 16 dias de maturação. No EHPV foi possível detectar a presença de 16 metabólitos, pertencentes principalmente as classes de flavonóides e triterpenos. Além disso, o EHPV apresentou elevado conteúdo fenólico e atividade antioxidante e antimicrobiana principalmente contra bactérias gram-positivas. A cultura *starter* comercial não foi capaz de resistir aos baixos valores de pH indicando que não apresenta tolerância a acidez estomacal. Das formulações de salame testadas, a formulação contendo 0,4% de própolis foi escolhida sensorialmente ($p > 0,05$), e durante a maturação apresentou redução na oxidação lipídica e no conteúdo de bases voláteis. Assim, a utilização do EHPV se mostra promissor como conservante natural em alimentos, principalmente em embutidos do tipo salame.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; embutido de peixe; probiótico.

ABSTRACT

MAFRA, J. F. Preparation of fish salami containing red propolis and starter culture: microbiological, physicochemical and sensory characteristics

Consumers have increasingly sought to eat healthy and preservative-free foods. Thus, this work aimed to investigate the chemical and biological properties of the hydroalcoholic extract of red propolis (EHPV), to verify if the commercial starter culture used in the fermentation of meat sausages has probiotic characteristics, and to evaluate the effect of EHPV on sensory characteristics, physico-chemical and microbiological characteristics of tilapia salami. EHPV was evaluated for phenolic content, antioxidant activity, identification of chemical compounds and antibacterial activity against food pathogens. The commercial starter culture was evaluated for resistance to different, antagonistic capacity using food pathogens, resistance to low pH values and bile salts; production of gas, capsule and acidification capacity; growth at different pH values and temperatures and sensitivity to different concentrations of curing salts. The inhibitory effect of EHPV on the starter culture was also observed. Sensory analysis of tilapia salami with BHT and different concentrations of EHPV (0.2, 0.4 and 0.6%) was performed. In the control treatments, positive (BHT) and negative, and in the formulation containing EHPV chosen sensorially, microbiological and physical-chemical analyzes were performed after 0, 2, 4, 8 and 16 days of maturation. In EHPV it was possible to detect the presence of 16 metabolites, belonging mainly to the flavonoid and triterpene classes. In addition, EHPV showed high phenolic content and antioxidant and antimicrobial activity, mainly against gram-positive bacteria. The commercial starter culture was not able to resist the low pH values indicating that it does not have stomach acid tolerance. From the tested salami formulations, the formulation containing 0.4% propolis was chosen sensorially ($p > 0.05$), and during maturation it presented a reduction in lipid oxidation and in the content of volatile bases. Thus, the use of EHPV is promising as a natural preservative in foods, especially in sausage-type sausages.

Keywords: Antioxidant activity; fish sausage; probiotic.

INTRODUÇÃO GERAL

O salame é um embutido produzido a base de subprodutos do processamento de carnes que sofre fermentação microbiana, cura, maturação, defumação ou não e dessecação (BRASIL, 2000). Este é um produto muito consumido no Brasil que com a adição de aditivos sintéticos para prolongar sua vida útil tem gerado resistência em seu consumo devido a demanda por dietas mais saudáveis e com baixo teor de conservantes (IBGE, 2010).

Embutidos como o salame são suscetíveis a deterioração oxidativa dos lipídios e a deterioração microbiana devido a ausência de tratamento térmico e o elevado teor de gordura (KRUMMENAUER et al., 2015). Os processos de deterioração podem afetar o salame durante as etapas de processamento, distribuição e armazenamento, respondendo com efeitos indesejáveis no sabor, aroma, textura e redução no valor nutritivo do alimento (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009). Uma forma da indústria de alimentos minimizar o problema da oxidação lipídica em embutidos tem sido com o uso de diferentes antioxidantes sintéticos, principalmente BHA (butil-hidroxil-anisol), BHT (butil-hidroxil-tolueno), e galato de propila (BRASIL, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006). No entanto, existem evidências de que o excesso dessas substâncias na dieta pode causar toxicidade ao organismo humano, inclusive câncer (HERNÁNDEZ et al, 2009). No Brasil o uso dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT e galato de propila é permitido de acordo com o limite de 10 mg/100g (BRASIL, 2006).

Atualmente, a conscientização e preocupação dos consumidores com a qualidade e segurança dos alimentos tem contribuído para o aumento de pesquisas por compostos naturais com propriedades antioxidantes e antimicrobianas a fim de substituir os aditivos químicos e minimizar os danos causados à saúde humana. Neste cenário, muitos produtos com potencial antioxidante surgiram, dentre eles, a própolis (KUNRATH et al., 2017). A própolis vermelha é uma resina produzida por abelhas *Apis mellifera* L. a partir de exsudatos coletados em diversas espécies vegetais, tendo como principal fonte resinífera a *Dalbergia ecastaphyllum* L., que é utilizada na proteção da colmeia contra insetos, fungos e bactérias, e como termorregulador. No Brasil, a própolis vermelha foi catalogada como o 13º tipo de

própolis que se diferencia dos demais tipos de própolis pela intensidade da coloração vermelha, composição química rica em isoflavonóides e alta atividade biológica (FREIRES et al., 2018).

A atividade biológica da própolis normalmente é relacionada a presença de compostos fenólicos e triterpenos, aos quais são atribuídas diversas propriedades terapêuticas como atividade antimicrobiana (RUFATTO et al., 2018), anti-inflamatória (TIVERON et al., 2016) e antioxidante (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Estas características fazem da própolis uma alternativa promissora de composto antimicrobiano e antioxidante natural para a indústria de alimentos.

Além de conservantes naturais, os consumidores têm buscado ingerir alimentos que ofereçam benefícios à saúde além de suas funções nutricionais básicas. Nesse contexto, a prática de incorporação de cepas probióticas em produtos cárneos fermentados, utilizando a carne de peixe como matéria prima, pode ser um estímulo ao consumo dessa proteína, bem como uma oportunidade para a elaboração de novos produtos funcionais. As culturas probióticas são definidas como “microrganismos vivos que em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL et al., 2014). Para uma cultura *starter* ser considerada probiótica deve ser resistente ao processo fermentativo, competidora e se desenvolver adequadamente para ter efeito positivo na promoção da saúde quando aplicada em embutidos (BERNARDI; GOLINELI; CONTRERAS-CASTILLO, 2010).

Um dos principais desafios para a comercialização de embutidos fermentados tipo salame é a utilização de aditivos químicos. Desse modo, a utilização de compostos naturais como a própolis na inibição da oxidação lipídica e da atividade microbiana em substituição aos aditivos químicos, bem como a adição de culturas *starter* com características probióticas é uma alternativa promissora para a produção de alimentos funcionais. Apesar de alguns trabalhos analisarem a própolis como antioxidante e antimicrobiano em embutidos, este é o primeiro relato do uso de própolis vermelha em embutido fermentado de tilápia.

OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo verificar o conteúdo químico, a atividade antioxidante e antimicrobiana de um extrato de própolis vermelha comercial, avaliar características probióticas de uma cultura *starter* comercial e verificar a influência desse extrato e dessa cultura nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame de tilápia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar as propriedades antioxidantes e antimicrobianas do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha;
- Investigar as características probióticas de uma cultura *starter* comercial usada na fermentação de embutidos cárneos;
- Avaliar a aceitação sensorial do salame de tilápia contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha;
- Verificar o efeito do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha na qualidade microbiológica e físico-química do salame de tilápia durante a maturação.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Produção e consumo de pescado

A produção aquícola mundial totalizou 110,2 milhões de toneladas em 2016, com um valor estimado de US\$ 243,5 bilhões, sendo representada principalmente pela produção de peixe com 54,1 milhões (t) (US\$ 99,2 bilhões), seguido da produção de moluscos e crustáceos com 17,1 (US\$ 19 bilhões) e 7,9 milhões (t) (US\$ 36,2 bilhões) respectivamente (FAO, 2018). Em relação à aquicultura e captura, a produção mundial de peixe foi de 46,8% em 2016, superando a produção de 2014 (44,1%). Nesse cenário, as Américas se destacaram como o terceiro continente com a maior produção de peixe, em relação à aquicultura interior, voltados para o consumo humano (FAO, 2018).

O Brasil tem se destacado como um dos principais produtores aquícolas do mundo. Somente em 2016 o montante estimado da produção aquícola total foi de 581 mil toneladas, representando um aumento de 3,18% em relação a 2014. Com essa produção o Brasil subiu para a 13^o posição entre os principais produtores aquícolas mundiais. Além disso, o Brasil é o 8^o maior produtor de peixe do mundo em relação à aquicultura interna, com uma produção equivalente a 507,1 mil toneladas em 2016 (FAO, 2018).

Em 2015, a produção da piscicultura nordestina foi de 84.119 toneladas e a espécie mais cultivada foi a tilápia, representando 63% da produção, seguida do tambaqui com 24,5%. No Nordeste, a Bahia apresentou uma produção de tilápia de 8.823,3 toneladas em 2015, totalizando 16,7% da produção da piscicultura nordestina, ficando atrás apenas do Ceará (52,7%) (VIDAL, 2016). A tilápia é bastante cultivada no Brasil devido a sua adaptação em diferentes condições ambientais, elevada produtividade, alta resistência a baixas concentrações de oxigênio, pouca suscetibilidade a doenças parasitárias, excelente conversão alimentar, como também a espécie mais aceita pelos consumidores no mercado nacional e internacional devido à ausência de espinhas em “Y”, sabor agradável e carne branca com textura firme (MELO; STIPP, 2001).

Impulsionado pelo crescimento da produção pesqueira e pela alta demanda, o comércio de peixe e produtos da pesca se expandiu consideravelmente nas

últimas décadas. Em 2016, com a população mundial alcançando 7,4 bilhões de pessoas, a produção mundial de peixe utilizada para o consumo humano direto aumentou para 148,8 milhões de toneladas. Na América latina o consumo de peixes ainda é pequeno com 9,8 kg per capita/ano, abaixo do recomendado pela FAO (12 kg/habitante/ano) (FAO, 2018).

O crescimento no consumo de peixe tem melhorado as dietas das pessoas por ser um alimento nutritivo e diversificado. Em 2015, 17% da ingestão de proteína animal da população mundial e 7% de toda a proteína consumida foi de peixe. O peixe é uma rica fonte de proteínas de alta qualidade, de fácil digestão, contém gorduras essenciais como ácido graxo ômega-3 e todos os aminoácidos essenciais, vitaminas (A, B e D) e minerais (cálcio, iodo, zinco, ferro e selênio) (FAO, 2018).

A tilápia do Nilo é considerada um peixe com moderado teor de gordura e um bom nível de proteína muscular. A composição química da carne de tilápia é composta de cerca de 77,13% de umidade, 2,6% de lipídeos, 19,36% de proteínas, 1,09% de cinzas e 0,983% de atividade de água (SIMÕES et al., 2007). Porcentagens similares da composição química de tilápia também foram encontradas por Sales e Sales (1990) e Yanar, Celik e Akamca (2006).

O peixe é um alimento muito nutritivo principalmente se ingerido inteiro, porém mesmo a ingestão de pequenas quantidades tem um impacto nutricional positivo e fornece benefícios para a saúde na proteção contra doenças cardiovasculares e ajuda no desenvolvimento fetal e infantil do cérebro e do sistema nervoso (FAO, 2018).

2. Embutidos de peixe na cadeia de processamento do pescado

Em 2016, 45% (67 milhões (t)) da produção mundial de peixe destinado para o consumo humano direto foi apresentado na forma de peixe vivo, fresco ou refrigerado. O restante da produção destinado para fins comestíveis foi ofertado em diferentes formas processadas, sendo 31% (46 milhões (t)) na forma congelada, 12% (18 milhões (t)) na forma de preparados e conservados e 12% (18 milhões (t)) na forma de curados (secos, salgados em salmoura, defumados e fermentados) (FAO, 2018).

Os embutidos são produtos alimentares obtidos a partir do processo de moagem da carne em uma granulometria variável de grossa a fina, de acordo com

o tipo de produto, condimentado e curado, fermentado, maturado, cozido, defumado, dessecado ou não, embutido em tripa natural (bexiga ou outra membrana animal) ou artificial (BRASIL, 2000). Entre os embutidos, se destaca o salame, que no Brasil são produzidos diferentes tipos, sendo eles: salame alemão, calabrés, friolano, hamburguês, italiano, milano, napolitano, salaminho e pepperoni, cuja designação é baseada em sua origem ou processo de obtenção (BRASIL, 2000).

No período de 2008 e 2009 a aquisição alimentar domiciliar per capita de salame no Brasil foi de 0,152 kg/ano, com o Nordeste alcançando a 3º maior aquisição no Brasil e a Bahia a 5ª maior do Nordeste (IBGE, 2010).

A produção de embutidos de carne de peixe é uma alternativa de beneficiamento da matéria prima para contribuir com o consumo de alimentos com elevado valor nutricional (BRASIL, 2000). Desta forma, torna-se atrativo e lucrativo a inclusão de novos produtos de peixe no mercado que apresentem características sensoriais desejáveis, que sejam práticos para o consumo e ao mesmo tempo saudáveis. Neste cenário tecnológico, diversos produtos à base de tilápia são descritos na literatura, como salsicha (OLIVEIRA FILHO et al., 2010), empanados (FERNANDES; PINTO; BONNAS, 2011) e almôndegas (OLIVEIRA; CRUZ; ALMEIDA, 2012).

3. Embutidos tipo salame

Tradicionalmente, se utiliza a carne suína ou mistura de suína e bovina para fabricar o salame. No entanto, carnes de diversos outros animais são objetos de estudo para a elaboração de embutidos fermentados (CAVALHEIRO et al., 2010; CRUXEN et al., 2018). As características sensoriais do salame no final do processamento dependem diretamente do tipo e qualidade da carne utilizada. Além disso, a carne utilizada no processamento deve estar resfriada e ser de boa qualidade microbiológica para reduzir a competição no início da fermentação (CAVALHEIRO et al., 2010).

As características sensoriais desejáveis em embutidos tipo salame são a tonalidade avermelhada, gordura esbranquiçada entremeada, podendo apresentar pontos de condimentos visíveis ao corte; e textura, sabor e odor característico (CAVALHEIRO et al., 2010).

O salame apresenta em sua formulação obrigatoriamente o mínimo de 60% de carne suína, toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio; e opcionalmente, carne bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas; intencionalmente, vinho, condimentos, aromas e especiarias, substâncias glazeantes como revestimento externo e cultivos iniciadores (*starter*) como coadjuvantes de tecnologia (BRASIL, 2000).

A gordura é um ingrediente importante, pois influencia positivamente o sabor, aroma, suculência e textura e, portanto, sua redução pode afetar a aceitação do produto. No entanto, a oxidação da gordura pode causar rancidez no alimento e conseqüentemente diminuir a vida útil dos produtos. Para evitar a oxidação é necessária a utilização de gorduras que apresentem alto ponto de fusão e tenham um baixo conteúdo de ácidos graxos insaturados. Por isso, a gordura dorsal de suínos é bastante utilizada, pois possui um baixo conteúdo de ácidos poliinsaturados linoleico e linolênico que são muito propensos a auto-oxidação (LADIKOS; LOUGOVOIS, 1990).

O cloreto de sódio, por sua vez, é um ingrediente extensivamente utilizado nos alimentos por diversas razões. Em concentrações adequadas, o sal age como conservante, inibindo o crescimento de microrganismos, reduzindo a atividade de água, contribuindo para uma fermentação desejável e intensificando o sabor dos produtos cárneos. Em embutidos fermentados, o cloreto de sódio é utilizado normalmente em uma concentração de 2%, mas apesar de contribuir na elaboração de embutidos favorece o desenvolvimento da rancificação da gordura devido ao seu próprio efeito oxidante, diminuindo a vida útil no armazenamento dos produtos (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2017).

Os conservantes nitrato e/ou nitrito de sódio e/ou potássio são usados em carnes curadas para desenvolver e fixar a cor da carne, intensificar sabor característico, inibir o crescimento microbiano, especificamente *Clostridium botulinum* e controlar eficientemente o odor de ranço inibindo a oxidação lipídica (SINDELAR; MILKOWSKI, 2012).

Em relação as culturas *starters*, essas consistem em mais de um microrganismo sendo que cada microrganismo desempenha um papel definido. Normalmente, apresentam um microrganismo acidificante como *Lactobacillus* para estabilizar o produto e um nitrato-redutor como *Staphylococcus* coagulase

negativa, para reduzir o nitrato a nitrito. As culturas podem ser adicionadas diretamente no produto em forma de pó ou podem ser dissolvidas em água (LUCKE, 2000). Os microrganismos responsáveis pela acidificação do produto são essenciais em embutidos fermentados pois a produção de ácido láctico promove a redução do pH e impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, além de conferir o típico sabor ácido, característico dos produtos fermentados (AYYASH et al., 2018).

4. Processo de fabricação de salame

O processo de fabricação do salame é complexo e envolve várias etapas: preparação da massa, embutimento, maturação e secagem. Inicialmente a massa é preparada moendo a carne e a gordura a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$, de modo a assegurar a limpeza do processo. O embutimento da massa preparada deve permitir a saída da água, a penetração da defumação (quando usada) e a retração durante a secagem (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

O processo de maturação envolve duas etapas: a primeira é a fermentação que ocorre por 3 a 7 dias e tem como resultado a acidificação do alimento, e a segunda é a desidratação em torno de 15 a 23 dias, a depender do calibre do embutido. Após a maturação, o embutido deve apresentar pH entre 5,2 e 5,4 e atividade de água igual a 0,87. A maturação do embutido deve ocorrer sob condições de umidade relativa, com temperatura e velocidade do ar controladas (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). Para que um embutido fermentado seja produzido com sucesso é necessário que apresente propriedades físico-químicas específicas definidas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade como umidade (máx.) 35%, proteína (min.) 25%, gordura (máx.) 32%, carboidratos (máx.) 4%, e aw (máx.) 0,92% (BRASIL, 2000).

O processo de secagem de embutidos sem tratamento térmico é longo e sua duração é determinada parcialmente pelo diâmetro do embutido. Esse processo de secagem ocorre em baixas temperaturas, normalmente entre $12\text{ a }15\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguido da diminuição progressiva da umidade relativa. É necessário que a perda de umidade seja gradual para evitar a formação de rugosidades, ressecamento excessivo da superfície e desprendimento da tripa (VARNAM; SUTHERLAND, 1998). A secagem se inicia ainda na fermentação quando o pH é reduzido para <

5,3, coagulando as proteínas miofibrilares e liberando água. Nesta etapa, os embutidos podem perder de 30 a 40% de seu peso inicial (VARNAM; SUTHERLAND, 1998).

5. Alterações no processamento e armazenamento de embutidos

5.1. Deterioração biológica

As características sensoriais de embutidos fermentados são resultantes de um complexo equilíbrio bioquímico, físico-químico e microbiológico que confere ao alimento boa aparência, sabor, textura e segurança. No entanto, quando esses parâmetros se encontram em desequilíbrio, a rápida deterioração e consequente diminuição da vida de prateleira são inevitáveis podendo colocar em risco a saúde dos consumidores (RIBEIRO et al., 2019).

A deterioração microbiana dos alimentos é um problema mundial mesmo com o avanço das técnicas de conservação e melhorias nos processos de produção, estocagem e distribuição dos alimentos e ainda geram grandes impactos negativos tanto econômico como ambiental. Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2011), cerca de um terço dos alimentos anuais produzidos no mundo para consumo humano, aproximadamente 1,3 bilhão de toneladas, é perdido ou desperdiçado. Desse montante, 54% das perdas ocorrem durante a produção, manuseio e armazenamento pós-colheita e o restante ocorre nos estágios de processamento, distribuição e consumo. Os desafios enfrentados pelo setor alimentício envolvem toda a cadeia produtiva, e a sua complexidade requer maior nível de controle em todas as etapas de produção (FAO, 2018).

O entendimento dos processos relacionados à deterioração microbiana dos alimentos é essencial para a busca por métodos eficazes de preservação. Os microrganismos necessitam de condições favoráveis para sua multiplicação e as características do alimento e do ambiente em que ele se encontra influenciam diretamente a diversidade microbiana capaz de se desenvolver (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os produtos cárneos são um meio de cultura ideal para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos pois apresentam fatores intrínsecos que favorecem o crescimento microbiano como alta atividade de água, pH favorável

para a maioria dos microrganismos e elevado teor de nutrientes e por isso é um dos produtos alimentares mais suscetíveis a deterioração (ALCÂNTARA; MORAIS; SOUZA, 2012).

O controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos está associado aos cuidados no processamento durante todas as etapas da cadeia produtiva, desde a produção da matéria prima até as condições higiênicas sanitárias dos manipuladores e utensílios, e o armazenamento do produto (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Em alimentos, a validade e a microbiota inicial são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a carga microbiana inicial, menor é a validade do produto. Além disso, a deterioração da carne ocorre mais facilmente em pH alto devido ao desenvolvimento de bactérias proteolíticas (ALCÂNTARA; MORAIS; SOUZA, 2012).

O tecido interno do músculo da carne é considerado estéril até o momento do corte e por isso, a deterioração de produtos cárneos está diretamente ligada ao crescimento de microrganismos na superfície da carne (ALCÂNTARA; MORAIS; SOUZA, 2012).

Os embutidos como salame e linguiça são frequentemente associados a alguma enfermidade veiculada por alimentos. A contaminação desses produtos pode ser originada da matéria prima ou da manipulação inadequada. Em condições inadequadas de processamento, estocagem e comercialização, a multiplicação incontrolável de microrganismos no alimento pode atingir cargas elevadas e causar infecções e intoxicações alimentares (WELKER et al., 2010).

O salame é um alimento bastante suscetível a deterioração microbiana, pois não sofre nenhum processamento térmico. Dessa forma, este produto apresenta o risco de crescimento não só de microrganismos deteriorantes, como também de microrganismos patogênicos, se for produzido de forma inadequada (CASARIL et al., 2017).

No processo de cura de alimentos, os sais inibem a germinação e proliferação de esporos de algumas bactérias, principalmente *C. botulinum* responsáveis pela produção de neurotoxinas causadora do botulismo, mas permitem o crescimento de outros microrganismos como algumas bactérias gram-positivas, bolores e leveduras (IAMARINO et al., 2015).

Os gêneros bacterianos mais relacionados a deterioração do pescado são *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp., *Alteromonas* spp., *Acinetobacter* spp. e *Moraxella* spp., devido à natureza psicotrófica e a capacidade de utilizar substâncias nitrogenadas não proteicas para seu crescimento. As principais espécies responsáveis por alterações sensoriais no pescado são *P. fluorescens*, *P. fragi* e *S. putrefaciens* devido à formação de ésteres, trimetilamina, substâncias voláteis redutoras e outros compostos com aroma pronunciado. Em relação a deterioração de peixes, os gêneros mais importantes são *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. Quantidade elevada dessa microbiota deteriorante causa redução da vida de prateleira do pescado em virtude da atividade proteolítica e lipolítica e multiplicação em temperaturas de refrigeração (LANZARIN et al., 2011).

A legislação brasileira RDC nº 12/2001 estabelece limites em amostra indicativa de *Salmonella* sp. (ausência), coliformes a 45 °C (10^3 NMP/g) e estafilococos coagulase positiva (5×10^3 UFC/g) em salame (BRASIL, 2001). Vale salientar que a infecção por *Salmonella* spp. está intimamente relacionada ao consumo de ovos, tortas, bolos, produtos cárneos e queijos. Esta bactéria coloniza o trato intestinal do homem e animais podendo causar infecções intestinais (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

As bactérias do grupo coliforme são consideradas as principais indicadoras de contaminação de origem fecal. Entre os coliformes a 45 °C está *Escherichia coli* que pode ser patogênica e um dos agentes mais comuns associados a surtos de infecção alimentar. A determinação de coliformes fornece informações sobre as condições higiênicas do produto e eventual presença de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2005; OLIVEIRA et al., 2010).

Os estafilococos têm como reservatório a pele, vias nasais e garganta do homem. Sua presença em alimentos indica higiene e manipulação inadequada. Algumas cepas são capazes de produzir toxinas termoestáveis responsáveis por toxinfecções e por isso é importante que alimentos crus como salames sejam manipulados com cuidado e de forma adequada de modo a evitar contaminação por esses microrganismos (MOTTIN; ABREU, 2011; FEITOSA et al., 2017).

Quando o alimento se encontra em avançado processo de deterioração microbiana os principais produtos finais formados são a presença de amoníaco, compostos sulfurados, H₂S e mercaptanos; substâncias inorgânicas, hidrogênio,

CO₂; ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico, valérico, láctico, succínico), ácidos aromáticos (benzoico, fenil propiônico e seus sais amoniacaís), bases orgânicas monoaminas (metilamina, dimetilamina e trimetilamina), monoaminas cíclicas (histamina e feniltilamina) e diaminas (putrescina e cadaverina) (ORDÓÑEZ, 2005).

A estabilidade microbiológica de embutidos fermentados é resultado de uma série de obstáculos à sobrevivência da microbiota deteriorante e patogênica. No entanto, quando essa estabilidade não é alcançada ocorre deterioração microbiana com consequentes alterações químicas, físicas e organolépticas (SOARES; GONÇALVES, 2012).

5.2. Deterioração química

A composição química dos peixes torna-os suscetíveis as alterações físico-químicas. Uma das principais causas de deterioração do pescado consiste na oxidação lipídica. As alterações oxidativas são manifestadas nos alimentos por meio de alterações no cheiro, cor, valor nutritivo, textura e produção de compostos tóxicos que afetam a aceitabilidade do consumidor, tornando os alimentos inadequados para o consumo (FOGAÇA; SANTANA, 2009).

Dentre os fatores que causam oxidação lipídica estão a presença de sistemas catalíticos como luz, calor, enzimas, metais, metaloproteínas e microrganismos levando a processos complexos de auto-oxidação, fotooxidação, oxidação térmica ou enzimática, envolvendo radicais livres e/ou outras espécies reativas como intermediário (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

A oxidação lipídica ocorre por meio da perda de elétrons durante a transferência destes de uma substância a outra. Normalmente, essa reação é causada pelo oxigênio atmosférico, mas também pode ser causada pelo ozônio, peróxido, metais e outros agentes oxidantes, embora menos frequentemente. O resultado da oxidação lipídica é a formação de radicais livres que promovem alterações sensoriais (SOARES; GONÇALVES, 2012).

O processo mais comum que leva a oxidação lipídica é chamado de auto-oxidação e resulta da reação espontânea do oxigênio atmosférico com os lipídeos por meio de uma reação em cadeia de radicais livres. A auto-oxidação ocorre em três estágios distintos: Reações de inicialização, onde os radicais lipídicos são

formados a partir de moléculas lipídicas, reações de propagação, em que um radical lipídico é convertido em um radical lipídico diferente e as reações de término, onde os radicais livres se combinam para formar moléculas com uma gama completa de elétrons (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Os principais componentes afetados pelas reações oxidativas são os ácidos graxos insaturados que podem estar presentes como ácidos graxos livres, ésteres alquílicos simples, acilgliceróis ou fosfolipídios. A grande quantidade de instauração das gorduras nos peixes torna esses alimentos mais suscetíveis a oxidação e ao ranço. A oxidação além de prejudicar a fluidez da membrana, também altera sua função como barreira semipermeável em virtude da perda de ácidos graxos poli-insaturados essenciais promovendo a formação de aldeídos, hidroperóxidos e outros produtos tóxicos secundários (FOGAÇA; SANTANA, 2009).

Os principais produtos finais da oxidação lipídica são os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como aldeídos, álcoois, ésteres, cetonas e outros hidrocarbonetos. A oxidação lipídica leva a diversos prejuízos nutricionais, destruição parcial dos ácidos graxos insaturados essenciais linoléico e linolênico, destruição parcial da vitamina C (co-oxidação), destruição parcial de outros lipídios insaturados como as vitaminas A, carotenóides e tocoferóis, formação de produtos secundários da oxidação lipídica (malonaldeído e outros compostos) e compostos de Maillard, capazes de reagir com biomoléculas (especialmente proteínas), diminuindo a absorção destas, entre outros (ESTERBAUER, 1993).

Em excesso, a oxidação lipídica leva o alimento a um nível de rancidez em que não é mais possível consumi-lo. Mesmo antes da oxidação lipídica alcançar níveis elevados, pode ocorrer a formação de moléculas tóxicas com possíveis danos à saúde humana (CHIZZOLINI; NOVELLI; ZANARDI, 1998). O processo oxidativo pode ser afetado ainda por vários fatores relacionados como as condições e o tempo de armazenamento, a tecnologia de processamento (moagem, mistura, aquecimento, etc.) e aditivos utilizados, quanto ao conteúdo de ácidos graxos insaturados da fração lipídica. Em embutidos cárneos fermentados e secos, o conteúdo de ácidos graxos insaturados compõe mais de 60% do total de ácidos graxos (MORISSEY et al., 1998).

Durante o armazenamento, normalmente ocorre lipólise e hidrólise de lipídeos aumentando o número de ácidos graxos insaturados livres no salame,

principalmente o ácido linoléico, oléico e araquidônico, tornando o produto mais suscetível às alterações oxidativas, principalmente devido a presença de lipases presentes na carne (ZANARDI et al., 2004).

6. O risco de conservantes sintéticos em alimentos

A conservação de produtos cárneos pode ser realizada por meio da combinação de diversos métodos assim como na conservação da maioria dos alimentos. Entretanto, a conservação da carne é mais complexa do que a de outros alimentos devido ao pH próximo da neutralidade, elevado teor de umidade, abundância de nutrientes e pela contaminação por microrganismos deteriorantes ser quase inevitável. Por isso, na maioria dos casos, a adição de aditivos químicos é necessária para prolongar sua vida útil (TOLDRÁ, 2017).

No Brasil, os aditivos químicos são definidos como qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais do alimento e aumentar sua segurança e estabilidade frente aos microrganismos (BRASIL, 1997). Entre os principais métodos de conservação da carne se destaca a cura. O processo de cura de produtos cárneos consiste basicamente da adição de nitrito, nitrato, sódio e açúcar e é considerado uma prática tradicional na indústria de alimentos (SINDELAR; MILKOWSKI, 2012).

Em concentrações aceitáveis, os conservantes além de melhorar as características sensoriais inibem o crescimento de microrganismos indesejáveis. No alimento, o nitrito e o nitrato reagem com aminas secundárias formando nitrosaminas que normalmente são carcinogênicas (SINDELAR; MILKOWSKI, 2012). Em altas doses, o nitrito pode causar cianose, náusea, anafilaxia, fraqueza, tonturas, vômitos, asma, dores abdominais, angiodema e gastrite, e a longo prazo podem desencadear tumores de esôfago, estômago, reto, cólon, mama e ovário e doenças do aparelho circulatório (FERREIRA, 2015).

O consumo de carnes curadas já foi associado ao câncer cerebral e leucemia infantil em uma série de estudos epidemiológicos (PETERS et al., 1994; PRESTON-MARTIN; LIJINSKY, 1994; PRESTON-MARTIN et al., 1996). Em virtude dos riscos associados a ingestão de nitrito e nitrato, o comitê FAO/WHO estabeleceu para o nitrito uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de 0 - 0,07 mg/kg/dia

de peso corpóreo e para o nitrato uma IDA de 0 - 3,7 mg/kg/dia de peso corporal, proibindo o emprego de nitrito em alimentos infantis para crianças menores de três meses (WHO, 2003).

A legislação brasileira estabelece limites do uso de nitrito de sódio e/ou potássio em carnes e produtos cárneos de 0,015 g/100g de nitrito e 0,3 g/100g de nitrato, ambos expressos como quantidade residual máxima de nitrito (BRASIL, 1997).

Diante dos efeitos maléficos dos sais de cura, estudos tem buscado compostos naturais com ação antimicrobiana e antioxidante para substituir os conservantes sintéticos. Um exemplo disso é o uso de extrato etanólico de *Kitaibelia vitifolia* na formulação de salsichas fermentadas a seco como substituto do nitrito (KURCUBIC et al., 2014).

Além dos sais de cura, outras substâncias comumente adicionadas em alimentos que prolongam o tempo de conservação são os antioxidantes. Esses aditivos protegem os alimentos de alterações provocadas pela oxidação como a rancidez e modificações de cor, impedindo que óleos e gorduras, principalmente ricos em ácidos graxos insaturados se combinem com o oxigênio do ar e se tornem rançosos (SILVA et al., 2014).

A utilização de antioxidantes sintéticos em embutidos cárneos é importante para reduzir os efeitos indesejáveis da oxidação lipídica e assim garantir a qualidade e segurança alimentar durante a vida útil do produto. Entretanto, embora o BHT seja classificado como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pela FDA (Food and Drug Administration), sua presença foi relatada no tecido adiposo da mama de mulheres com câncer de mama (HERNÁNDEZ et al, 2009).

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos são o BHA, BHT e PG. Esses compostos são capazes de sequestrar elétrons reativos e atuam de forma diferente a depender da aplicação (NIEVA-ECHEVARRÍA et al., 2014). Entre os antioxidantes disponíveis para o uso na legislação brasileira, apenas o PG, BHA e BHT apresentam restrição quanto ao limite máximo permitido em produtos cárneos devido aos potenciais riscos associados a sua ingestão (BRASIL, 1997).

A adição de BHT em alimentos é permitido nacionalmente e internacionalmente. O Brasil estabelece o limite máximo de 0,01g /100g para carnes e produtos cárneos (BRASIL, 1997). Já a European Food Safety Authority

(EFSA) permite dose diária de BHT de 0,25 mg por kg de peso corporal por dia (EFSA, 2012). Apesar da legislação brasileira e internacional permitir o uso de BHT em embutidos cárneos como o salame, a pressão dos consumidores na produção de alimentos mais seguros, tem impulsionado o aumento do interesse em novas pesquisas com antioxidantes naturais (KUNRATH et al., 2017).

7. Conservantes naturais

O interesse por alimentos mais naturais vem crescendo diante dos riscos oferecidos pela ingestão de conservantes sintéticos. Desse modo, maior ênfase tem sido dada a identificação de compostos naturais com atividade antioxidante e antimicrobiana que possam atuar sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos como alternativa na prevenção da deterioração oxidativa e microbiana dos alimentos (KURCUBIC et al., 2014).

As indústrias, especialmente do setor cárneo têm buscado utilizar produtos naturais para preservar e aumentar a vida útil de seus produtos sob o ponto de vista microbiológico e físico-químico em detrimento dos conservantes sintéticos (KUNRATH et al., 2017; SAVOLDI et al, 2019).

Os antioxidantes naturais como os tocoferóis, ácido cítrico e alguns óleos essenciais têm sido bastante explorados em alimentos visto que possuem potencial de inibição da rancificação (OLIVEIRA et al., 2012). Os tocoferóis são considerados os principais antioxidantes de alimentos por apresentar boa ação em vegetais e gordura animal (ANGELO; JORGE, 2007). De acordo com Del Ré e Jorge (2012) os extratos de manjeriço e tomilho apresentam compostos como eugenol, timol e carvacrol que são capazes de inibir a oxidação.

A utilização de parabenos, acidulantes, sorbato e nisina foram propostas como substituição do papel antibotulinal do nitrito em carnes curadas. No entanto, poucas dessas propostas obtiveram sucesso uma vez que a adição dos agentes conservantes deve ser segura, prática, eficaz e econômica (PIERSON; SMOOT; ROBACH, 1983). Entre os produtos naturais que tem demonstrado resultados promissores frente à ações antioxidantes e antimicrobiana pode-se citar a própolis que é definida pela Instrução Normativa nº 3 de 19 de janeiro de 2001 como um produto natural complexo oriundo de diferentes partes de plantas como brotos, flores, exsudatos de plantas coletados por abelhas e adicionados de secreções

salivares, ceras e pólen (BRASIL, 2001). A principal função dessa resina consiste na proteção da colmeia contra insetos e microrganismos invasores. Geralmente, a própolis é composta de 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, microelementos e vitaminas (PARK et al., 2002; FUNARI; FERRO, 2006).

A coloração da própolis depende de sua origem botânica e pode variar para marrom, verde ou vermelho. A própolis vermelha tem atraído atenção de pesquisadores do mundo todo devido a suas propriedades medicinais como ação antioxidante (ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011; FROZZA et al., 2013), antimicrobiana (REGUEIRA NETO et al., 2017), citotóxica (AWALE et al., 2008; FRANCHI et al., 2012; FROZZA et al., 2013; REGUEIRA-NETO et al., 2018), anti-inflamatória (LEDÓN et al., 1996), cicatrizante (ALBUQUERQUE JÚNIOR et al., 2009), dentre outras.

A própolis vermelha é classificada como o 13º grupo de própolis brasileira e pode ser encontrada no nordeste do Brasil, mais especificamente em manguezais nos Estados de Alagoas, Sergipe, Paraíba, Pernambuco e Bahia. Sua principal origem botânica foi identificada como *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. (Fabaceae), popularmente conhecido como "rabo-de-bugio" (RUFATTO et al., 2017).

A composição química da própolis vermelha é bastante complexa e variada, pois depende da flora específica no local da coleta. Os principais constituintes químicos da própolis vermelha são os terpenos, flavonóides, compostos alifáticos, ácidos graxos e elementos inorgânicos como cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício (RUFATTO et al., 2017).

A substituição de antioxidante sintético pela própolis em produtos cárneos tem demonstrado resultados positivos. De acordo com Queiroz et al. (1996), a própolis na concentração de 0,25% exerceu efeito antioxidante em filés de peixe e foi equivalente ao BHT nessa concentração. Além disso, na concentração de até 0,5% a própolis não conferiu sabor residual à carne de peixe. Recentemente, Kunrath et al. (2017) observaram que o extrato de própolis demonstrou ser um potente antioxidante natural na aplicação em salame tipo italiano de carne de porco.

Quando comparado à atividade antioxidante do nitrito de sódio em salsichas o extrato etanólico de própolis também apresentou capacidade semelhante. Além

disso, nesse mesmo produto, as características sensoriais foram aceitas pelos consumidores embora a cor poderia ter sido melhorada (GUTIÉRREZ-CORTÉS; MAHECHA, 2014). Ainda segundo os autores, o extrato etanólico de própolis apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 0,8 mg/mL frente *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus* e *Clostridium* sp., demonstrando o potencial da própolis na substituição dos sais de cura.

8. Uso de probióticos em embutidos

Inicialmente, o processo fermentativo era resultado da atividade de microrganismos presentes naturalmente nos alimentos. Hoje, culturas puras são adicionadas em uma ampla variedade de alimentos visando garantir sua segurança, refinar o aroma, sabor e textura, reduzir o tempo de processamento e consequentemente os custos, aumentar a qualidade dos produtos por meio da utilização de culturas produtoras de bacteriocinas e com propriedades probióticas (HUGAS; MONFORT, 1997; INCZE, 1998; KHAN et al., 2011; WORAPRAYOTE et al., 2016).

As culturas *starter* ou culturas iniciadoras são preparações que contêm microrganismos vivos ou em estado latente que se desenvolvem pela fermentação de um determinado substrato (HAMMES; HERTEL, 1998). Sua função consiste em alterar de forma benéfica as propriedades de alimentos como carnes e produtos cárneos. Os principais objetivos das culturas *starter* consistem em melhorar a segurança do produto por meio da competição com patógenos, estender a vida útil do produto pela inibição de microrganismos deteriorantes e modificar a matéria prima, para obter novas propriedades sensoriais. As culturas *starter* são utilizadas em escala industrial e geralmente são compostas por mais de uma espécie de microrganismo de modo a somar suas ações e obter o efeito desejado no produto final (BERNARDI; GOLINELI; CONTREARAS-CASTILLO, 2010).

A qualidade microbiológica e sensorial de embutidos cárneos fermentados é determinada pelas complexas interações química, bioquímica e física existentes entre as frações de gordura, proteína e carboidrato da própria carne ou da atividade microbiana. Na fermentação de produtos cárneos, as bactérias lácticas melhoram a segurança e desenvolvem as características sensoriais, enquanto outros microrganismos como alguns do gênero *Staphylococcus* estabilizam as

propriedades sensoriais (LUCKE, 2000; KOŁOZYN-KRAJEWSKA; DOLATOWSKI, 2012).

Culturas *starter* funcionais apresentam funcionalidade adicional quando comparadas com as culturas clássicas, melhorando e otimizando o processo de fermentação dos embutidos. Nesse sentido, se encontram microrganismos que produzem compostos antimicrobianos como bacteriocinas, endopeptidases, reuterina e reuteriniclina, compostos que contribuem para o desenvolvimento da cor e do aroma, características probióticas e não apresentam produção de aminas biogênicas e compostos tóxicos (LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006; BERNARDI; GOLINELI; CONTREARAS-CASTILLO, 2010).

As culturas probióticas são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando ingeridos em quantidades suficientes. Essas culturas devem apresentar resistência ao processo fermentativo, tolerar o trato gastrointestinal do ser humano, além de serem competidores e se desenvolverem adequadamente para ter efeito positivo na promoção da saúde de modo que as propriedades sensoriais do embutido não sejam afetadas negativamente (CAVALHEIRO et al., 2015).

O uso de culturas probióticas em embutidos cárneos é mais promissor em produtos crus fermentados como os salames visto que não são cozidos durante a elaboração ou antes do consumo, o que causaria a morte dos microrganismos adicionados. Mesmo em embutidos fermentados como os salames, a utilização de probióticos ainda tem sido elementar, pois está condicionada a capacidade dessas bactérias resistirem as condições desafiadoras durante o processo de fermentação como baixo valor de pH, atividade de água e microrganismos competidores (KOŁOZYN-KRAJEWSKA; DOLATOWSKI, 2012). Inúmeras estirpes têm sido avaliadas para utilização como probióticos em embutidos, entre elas tem-se *Lactobacillus paracasei* (MACEDO et al., 2008; COMAN et al., 2012) e *L. casei* (MACEDO et al., 2008).

Para uma cepa ser considerada probiótica, vários critérios devem ser satisfeitos incluindo sobrevivência através da via gastrointestinal, tolerância a ácidos e sais biliares, capacidade de aderir a superfícies intestinais, boas propriedades tecnológicas, atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas, dentre outros (ERKKILA et al., 2001). Além disso,

existe uma preocupação com o uso de probióticos que apresentam genes de resistência a drogas em alimentos. A resistência microbiana pode estar relacionada com genes localizados no cromossomo, transposon ou plasmídeo. Bactérias que apresentam genes de resistência a drogas transmissíveis não devem ser usadas em alimentos (FAO; WHO, 2006). Portanto, a incorporação de cepas probióticas em embutidos fermentados de peixe, pode ser um estímulo ao consumo dessa proteína de alto valor biológico, e uma oportunidade para a elaboração de novos produtos funcionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C. D; BARRETO, A. L. S; PIRES, J. A; REIS, F. P; LIMA, S. O; RIBEIRO, M. A. G; CARDOSO, J. C. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology**, v. 27, n. 3, p. 1105–1110, 2009.

ALCÂNTARA, M; MORAIS, I. C. L; SOUZA, C. M. O. C. C. Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.6, n.1, p. 5–18, 2012.

ALENCAR, S. M; OLDONI, T. L; CASTRO, M. L; CABRAL, I. S; COSTA-NETO, C. M; CURY, J. A; ROSALEN, P. L; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ANGELO, P. M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

AWALE, S; LI, F; ONOZUKA, H; ESUMI, H; TEZUKA, Y; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n.2, p. 181-189, 2008.

AYYASH, M; ABUSHELAIBI, A; AL-MAHADIN, S; ENAN, M; EL-TARABILY, K; SHAH, N. In-vitro investigation into probiotic characterisation of *Streptococcus* and *Enterococcus* isolated from camel milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, n. 1, p. 478–487, 2018.

BERNARDI, S; GOLINELI, B. B; CONTRERAS-CASTILLO. Aspects of the application of starter cultures in fermented meat sausage production. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 2, p. 133-140, 2010.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução Normativa interministerial n. 22 de 31 de julho de 2000. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de salame. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 03 agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da agricultura e do abastecimento. Instrução normativa interministerial nº 3 de 19 de janeiro de 2001. Regulamento técnico para fixação de entidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 8 de dezembro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução normativa interministerial nº 51 de 29 de dezembro de 2006. Regulamento Técnico de

Atribuição de Aditivos, e seus Limites das seguintes Categorias de Alimentos 8: Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 30 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997. Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 28 de outubro de 1997.

CABRAL, I. S. R; OLDONI, T. L. C; PRADO, A; BEZERRA, R. M. N; ALENCAR, S. M. D; IKEGAKI, M; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1523–1527, 2009.

CASARIL, K. B. P. B; BENTO, C. B. P; HENNING, K; PEREIRA, M; DIAS, V. A. Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.7, n.2, p.75-85, 2017.

CAVALHEIRO, C. P., RUIZ-CAPILLAS, C., HERRERO, A. M., JIMÉNEZ-COLMENERO, F., MENEZES, C. R., FRIES, L. L. M. Application of probiotic delivery systems in meat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 120-131, 2015.

CAVALHEIRO, C. P; TERRA, N. N; FRIES, L. L. M; MILANI, L. I. G; REZER, A. P. S; CAVALHEIRO, C. V; MANFIO, M. Características físico-químicas de embutido curado fermentado com adi o de carne de avestruz associada   de suíno. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p. 447-452, 2010.

CHIZZOLINI, R.; NOVELLI, E.; ZANARDI, E. Oxidation in traditional mediterranean meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 87-99, 1998.

COMAN, M. M; CECCHINI, C; VERDENELLI, M. C; SILVI, S; ORPIANESI, C; CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO , a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 346–52, 2012.

CRUXEN, C. E. S.; BRAUN, C. L. K.; FAGUNDES, M. B.; GULARTE, M. A.; WAGNER, R.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Development of fermented sausage produced with mutton and native starter cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 95, n. 2, p. 23-31, 2018.

DEL R , P. V; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplica es em alimentos e implica o na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n. 2, p.389-399, 2012.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on the reevaluation of Butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. **EFSA Journal**, v. 10, n. 3, p. 1-43, 2012.

ERKKILA, S; PETAJA, E; EEROLA, S; LILLEBERG, L; MATTILA-SANDHOLM, T; SUIHKO, M-L. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. **Meat Science**, v. 58, n. 2, p. 111–116, 2001.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, n.5, p. 779-786, 1993.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Roma, 2006, p. 56. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acesso em: 24 out. 2019.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention**. Roma, 2011, p. 37. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i2697e.pdf> . Acesso em: 15 out. 2019.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Roma, 2018, p. 227. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2019.

FEITOSA, A. C; RODRIGUES, R. M; TORRES, E. A. T; SILVA, J. F. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Desafios**, v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

FERNANDES, M. P.; PINTO, L. S. R. C.; BONNAS, D. S. Aproveitamento de resíduos da filetagem de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na elaboração de empanados. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 1385-1390, 2011.

FERREIRA, F. S. Aditivos alimentares e suas reações adversas no consumo infantil. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 13, n. 1, p. 397-407, 2015.

FOGAÇA, F. H. S; SANTANA, L. S. Oxidação lipídica em peixes: mecanismo de ação e prevenção. **Archives of Veterinary Science**, v.14, n.2, p.117-127, 2009.

FRANCHI, G. C; MORAES, C. S; TORETI, V. C; DAUGSCH, A; NOWILL, A. E; PARK, Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n.1, p.1-6, 2012.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005, 182 p.

FREIRES, I. A., PINGUEIRO, J. M. S., MIRANDA, S. L. F., BUENO-SILVA, B. Red propolis: phenolics, polyphenolics, and applications to microbiological health and disease. In: WATSON, R. R., PREEDY, V. R., ZIBADI, S. (Coord.). **Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease**. 2^a ed. Cambridge: Academic Press, 2018. cap. 24, p. 293-300.

FROZZA, C. O. D. S; GARCIA, C. S. C; GAMBATO, G; SOUZA, M. D. O; SALVADOR, M; MOURA, S; PADILHA, F. F; SEIXAS, F. K. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, n. 2, p. 137–142, 2013.

FUNARI, C. S; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 171-178, 2006.

GUTIÉRREZ-CORTÉS, C; MAHECHA, H. S. Antimicrobial activity of propolis and its effect on the physicochemical and sensorial characteristics in sausages. **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 21, n. 2, p. 90-96, 2014.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 125-138, 1998.

HERNÁNDEZ, F; PORTOLÉS, T; PITARCH, E; LÓPEZ, F. J. Searching for anthropogenic contaminants in human breast adipose tissues using gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 1, p.1-11, 2009.

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R. B., FLINT, H.J., SALMINEN, S., CALDER, P. C., SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**. v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HUGAS, M; MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 547–54, 1997.

IAMARINO, L. Z; OLIVEIRA, M. C; ANTUNES, M. M; OLIVEIRA, M; RODRIGUES, R. O; ZANIN, C. I. C. B; SCHIMILE, M; LIMA, A. A. Nitritos e Nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. **Gestão em Foco**, v. 7, n. 4, p. 246-251, 2015.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisas de orçamentos familiares 2008-2009**. Rio de Janeiro, 2010, 150 p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2019.

INCZE, K. Dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 49, n. 5, p. 169–77, 1998.

KHAN, M. I; ARSHAD, M. S; ANJUM, F. M; SAMEEN, A; REHMAN, A; GILL, W. T. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. **Food Research International**, v. 44, n. 3, p. 3125–33, 2011.

KOŁOZYŃ-KRAJEWSKA, D; DOLATOWSKI, Z. J. Probiotic meat products and human nutrition. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1761–1772, 2012.

KRUMMENAUER, E. P; PARANHOS, G. O; SILVA, J. F; SILVA-BUZANELLO, R. A; KALSCHNE, D. L; CORSO, M. P; CANAN, C. Salame tipo Milano com substituição parcial do toucinho por queijo mussarela. **Revista Cultivando o Saber**, v. 8, n. 2, p. 143-161, 2015.

KUNRATH, C. A; SAVOLDI, D. C; MILESKI, J. P. F; NOVELLO, C. R; ALFARO, A. T; MARCHI, J. F; TONIAL, I. B. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n. 3, p. 1–10, 2017.

KURCUBIC, V. S; MASKOVIC, P. Z; VUJIC, J. M; VRANIC, D. V; VESKOVIC-MORACANIN, S. M; OKANOVIC, D. G. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kitaibelia vitifolia* extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage. **Meat Science**, v. 97, n. 4, p. 459–467, 2014.

- LADIKOS, D; LOUGOVOIS, V. Lipid Oxidation in Muscle Foods: A Review. **Food Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 295-314, 1990.
- LANZARIN, M; ALMEIDA FILHO, E. S; RITTER, D. O; MELLO, C. A; CORRÊA, G. S. S; IGNÁCIO, C. M. S. Ocorrência de *Aeromonas* sp. e microrganismos psicrotróficos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) mantidos sob refrigeração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1541-1546, 2011.
- LEDÓN, N; CASACO, A; GONZALEZ, R; MERINO, N; GONZALEZ, A; TOLON, Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 30, n. 7, p. 274–276, 1996.
- LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 270-285, 2006.
- LUCKE, F. K. Review: Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, n. 2, p. 105-115, 2000.
- MACEDO, R. E. F., PELANZER JÚNIOR, S. B., TERRA, N. N., FREITAS, R. J. S. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 509-519, 2008.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 1–11, 2009.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. **Food Research International**, v. 94, n. 5, p.90-100, 2017.
- MELO, A. R; STIPP, N. A. F. A piscicultura em cativeiro como alternativa econômica para as áreas rurais. **Geografia**, v. 10, n. 2, p. 175-193, 2001.
- MORISSEY, P.A.; SHEEHY, P.J.A.; GALVIN, K.; KERRY, J.P.; BUCKLEY, D.J. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 73-86, 1998.
- MOTTIN, V. D; ABREU, A. F. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em manipuladores de produtos cárneos em açougues de Ji-Paraná, Rondônia. **Veterinária em Foco**, v.9, n.1, p. 32-41, 2011.
- NIEVA-ECHEVARRÍA, B; MANZANOS, M. J; GOICOECHEA, E; GUILLÉN, M. D. 2,6-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene and Its Metabolites in Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 1, p.67-80, 2014.
- OLIVEIRA FILHO, P. R. C.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; TRINDADE, M. A.; BALIEIRO, J. C. C.; VIEGAS, E. M. M. Quality of sausage elaborated using minced Nile Tilapia submitted to cold storage. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 2, p.183-190, 2010.

OLIVEIRA, A. B. A; PAULA, C. M. D; CAPALONGA, R; CARDOSO, M. R. I; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, M. C.; CRUZ, G. R. B.; ALMEIDA, N. M. Características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de "almôndegas" à base de polpa de Tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Unopar Científica**, v. 14, n. 1, p. 37-44, 2012.

OLIVEIRA, R.R; LAGE, M. E; SILVEIRA NETO, O. J; SALES, M. C. Antioxidantes naturais em produtos cárneos. **PUBVET**, v. 6, n. 10, p. 1319-1324, 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos de origem animal**. São Paulo: Artmed; 2005, 280 p.

PARK, Y.K; ALENCAR, S. M; SCAMPARINE, A. R. P; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, n. 3, p. 997-1003, 2002.

PETERS, J. M; PRESTON-MARTIN, S; LONDON, S. J; BOWMAN, J. D; BUCKLEY, J. D; THOMAS, D. C. Processed meats and risk of childhood leukemia (California, USA). **Cancer Causes Control**, v. 5, n. 2, p. 195–202, 1994.

PIERSON, M. D; SMOOT, L. A; ROBACH, M. C. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 17, n. 2, p.141-187, 1983.

PRESTON-MARTIN, S; LIJINSKY, S. W. Cured meats and childhood cancer. **Cancer Causes Control**, v. 5, n. 4, p. 484–485, 1994.

PRESTON-MARTIN, S; POGODA, J. M; MUELLER, B. A; HOLLY, E. A; LIJINSKY, W; DAVIS, R. L. Maternal consumption of cured meats and vitamins in relation to pediatric brain tumors. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 5, n. 6, p. 599–605, 1996.

PRICE, J. F; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1994, 581 p.

QUEIROZ, M. I; BADIALE-FURLONG, E; COELHO, C. S. P; ZÍLIO, R. L; CORREA, A. C. Avaliação do comportamento da oxidação de carne de pescado salgado tratado com própolis. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 2, p. 273-280, 1996.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REGUEIRA NETO, M. S; TINTINO, S. R; SILVA, A. R. P; COSTA, M. S; BOLIGON, A. A; MATIAS, E. F. F; BALBINO, V. Q; MENEZES, I. R. A; COUTINHO, H. D. M. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, n. 5, p. 572-580, 2017.

REGUEIRA-NETO, M. S. Antitrypanosomal, antileishmanial and cytotoxic activities of Brazilian red propolis and plant resin of *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. **Food and Chemical Toxicology**, v. 18, n. 2, p.1-5, 2018.

RIBEIRO, J. S., SANTOS, M. J. M. C., SILVA, L. K. R., PEREIRA, L. C. L., SANTOS, I. A., DA SILVA LANNES, S. C., SILVA, M. V. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. **Meat Science**, v. 148, n. 2, p. 181–188, 2019.

RIGHI, A. A; ALVES, T. R; NEGRI, G; MARQUES, L. M; BREYER, H; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 4, p. 2363–2370, 2011.

RUFATTO, L. C., LUCHTENBERG, P., GARCIA, C., THOMASSIGNY, C., BOUTTIER, S., HENRIQUES, J. A. P., ROESCH-ELY, M., DUMAS, F., MOURA, S. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, v. 214, n. 3, p. 74–82, 2018.

RUFATTO, L. C; SANTOS, D. A; MARINHO, F; HENRIQUES, J. A. P; ELY, M. R; MOURA, S. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591-598, 2017.

SALES, R. O; SALES, A. M. Estudo da composição química e rendimento de dez espécies de água doce de interesse comercial nos açudes do nordeste brasileiro. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 1, n. 21, p. 27-30, 1990.

SAVOLDI, D. C., KUNRATH, C. A., OLIVEIRA, D. F., NOVELLO, C. R., COELHO, A. R., MARCHI, J. F., TONIAL, I. B. Características físicas e sensoriais de Salame Tipo Italiano com adição de própolis. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 18, n. 2, p. 212–221, 2019.

SHAHIDI, F., AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, n. 2, p. 820–897, 2015.

SHAHIDI, F; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p.4067-4079, 2010.

SILVA, E. R; WANDERLEY, R. O. S; MACHADO, A. V; COSTA, R. O. Tecnologia de Conservação dos Alimentos pelo Uso de Aditivos Químicos. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v.4, n.1, p. 10-14, 2014.

SIMÕES, M. R; RIBEIRO, C. F. A; RIBEIRO, S. C. A; PARK, K. J; MURR, F. E. X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 608-613, 2007.

SINDELAR, J. J; MILKOWSKI, A. L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric Oxide**, v. 26, n. 3, p. 259-266, 2012.

SOARES, K. M. P; GONÇALVES, A. A. Qualidade e segurança do pescado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 1-10, 2012.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Varela, 2004, 152p.

TIVERON, A. P., ROSALEN, P. L., FRANCHIN, M., LACERDA, R. C. C., BUENO-SILVA, B., BENSO, B., DENNY, C., IKEGAKI, M., & ALENCAR, S. M. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south brazilian organic propolis. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. 104-109, 2016.

TOLDRÁ, F. The Storage and Preservation of Meat: III Meat processing. In: TOLDRÁ, F. (Coord.). **Lawrie's Meat Science**. 8ª ed. Amsterdã: Elsevier, 2017. cap 9, p. 265-296.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos cárnicos: Tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1998, 438p.

VIDAL, M. F. Panorama da piscicultura no Nordeste. **Caderno setorial ETENE**. v.1, n.3, p. 13-19, 2016.

WELKER, C. A. D; BOTH, J. M. C; LONGARAY, S. M; HAAS, S; SOEIRO, M. L. T; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Safety Evaluation of Certain Food Additives**. Geneva, 2003, 378 p. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/171781/9789240693982_eng.pdf?sequence=3. Acesso em: 15 nov. 2019.

WORAPRAYOTE, W; MALILA, Y; SORAPUKDEE, S; SWETWIWATHANA, A; BENJAKUL, S; VISESSANGUAN, W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, n. 2, p. 118–132, 2016.

YANAR, Y; CELIK, M; AKAMCA, E. Effects of brine concentration on shelf-life of hot-smoked tilapia (*Oreochromis niloticus*) stored at 4 °C. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 244–247, 2006.

ZANARDI, E; GHIDINI, S; BATTAGLIA, A; CHIZZOLINI, R. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. **Meat Science**, v. 66, n. 2, p. 415-423, 2004.

CAPÍTULO 1

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA: POTENCIAL APLICAÇÃO NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS

Food Science and Technology

Estudo químico e biológico do extrato de própolis vermelha: potencial aplicação na conservação de alimentos

Chemical and biological study of red propolis extract: potential application in food preservation

Jéssica Ferreira Mafra^{1,11}, Alexsandra Iarlen Cabral Cruz^{2,11}, Tiago Sampaio de Santana^{3,11},
Fabrício Mendes Miranda^{4,11}, Mariza Alves Ferreira^{5,11}, Floricea Magalhães Araújo^{6,10},
Paulo Roberto Ribeiro de Jesus^{7,10}, Yuji Nascimento Watababe^{8,10}, Norma-Suely
Evangelista-Barreto^{9,11}

¹Mafra, JF. E-mail: jelmafra@hotmail.com.

²Cruz, AIC. E-mail: iarlen007@gmail.com

³Santana, TS. E-mail: tiagosampaio20@hotmail.com

⁴Miranda, FM. E-mail: fabriquimico@yahoo.com.br

⁵Ferreira, MA. E-mail: marizaufrb@yahoo.com.br

⁶Araújo, FM. E-mail: floriceaaraujo@gmail.com

⁷Jesus, PRR. E-mail: paulodc3@gmail.com

⁸Watanabe, YN. E-mail: yuji.ssa@gmail.com

⁹Evangelista-Barreto, NS. E-mail: nsevangelista@yahoo.com.br. Fone: 75.3621-1558

¹⁰Universidade Federal da Bahia – UFBA, Rua Barão de Geremoabo S/N, Ondina, CEP 40015-030, Salvador, BA, Brasil.

¹¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Rua Rui Barbosa, 710, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.

Resumo

Este estudo investigou as propriedades químicas e biológicas do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV) visando o seu potencial como conservante alimentar. Foram avaliados o conteúdo de fenóis totais e flavonóides totais, a composição química do EHPV por meio de técnica cromatográfica (CG-EM), atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e atividade antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes* e *Enterococcus faecalis*). O EHPV apresentou fenóis de 1,4% e flavonóides de 10,4%, valores estes superiores ao estabelecido na legislação brasileira e atividade antioxidante para o método ABTS de 1638,56 μM trolox g^{-1} própolis e DPPH IC_{50} de 1,4 mg mL^{-1} . A própolis vermelha apresenta 16 metabólitos, sendo os flavonoides e triterpenos as principais classes encontradas. O EHPV apresentou forte atividade inibitória contra *L. monocytogenes* (0,05 mg mL^{-1}) e *E. faecalis* (0,1 mg mL^{-1}) e maior ação bactericida contra *S. aureus* (3,12 mg mL^{-1}) e *V. parahaemolyticus* (3,44 mg mL^{-1}). O EHPV apresenta diversificada composição química e elevada atividade antioxidante e antimicrobiana, sugerindo potencial aplicação como conservante em alimentos em substituição aos conservantes sintéticos.

Palavras-chave: *Dalbergia ecastaphylum*, aditivos, deteriorações oxidativas

1. Introdução

A indústria alimentícia frequentemente recorre ao uso de aditivos químicos para inibir as deteriorações oxidativas e microbianas que comprometem a vida útil dos alimentos. No entanto, aditivos químicos, como os antioxidantes sintéticos foram detectados no tecido da mama de mulheres com câncer de mama, indicando possível relação de sua ingestão com o desenvolvimento de câncer (Hernández, Portolés, Pitarch & López, 2009). Com as implicações toxicológicas associadas ao uso de aditivos, os consumidores têm buscado, cada

vez mais, alimentos em que a adição de conservantes sintéticos seja reduzida ou inexistente (Carocho, Morales & Ferreira, 2015).

Nesse cenário, muitas pesquisas têm se concentrado na busca de produtos naturais com potencial conservante como a própolis vermelha, resina produzida por abelhas a partir da coleta de exsudatos de diversas origens botânicas, principalmente da espécie vegetal *Dalbergia ecastaphylum*, que tem chamado atenção devido sua rica composição fenólica (Andrade, Denadai, Oliveira, Nunes & Narain, 2017). Apesar da própolis de várias regiões do mundo ser bastante estudada, a pesquisa da própolis vermelha do Estado da Bahia, Nordeste do Brasil, ainda é pouco explorada (Rogueira Neto et al., 2017). Estudos químicos apontam que a composição específica de metabólitos na própolis é resultado de um conjunto de fatores, dentre eles a região geográfica, estação do ano e condições ambientais (Miguel, Nunes, Dandlen, Cavaco & Antunes, 2014).

Na própolis vermelha brasileira geralmente são identificados isoflavonóides, pterocarpanos, chalconas, flavonóides, prenilados, benzofenonas, terpenos e taninos (Freires et al., 2018), mas sua diversificada atividade biológica tem sido atribuída principalmente ao rico teor fenólico (Andrade, Denadai, Oliveira, Nunes & Narain, 2017). Embora existam diferenças qualitativas e quantitativas nos flavonóides presentes na própolis vermelha, normalmente são encontrados formononetina, pinocembrina, medicarpin e vestiol. Outras própolis já foram avaliadas como antioxidantes naturais em alimentos, especialmente em embutidos (Han & Park, 2002; Kunrath et al., 2017; Savoldi et al., 2019).

O objetivo desse estudo foi quantificar e identificar os compostos bioativos do extrato comercial da própolis vermelha e verificar sua capacidade em capturar radicais livres e inibir patógenos alimentares, visando uma potencial aplicação como conservante em alimentos.

2. Materiais e métodos

2.1. Extrato da própolis vermelha

O extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV) com rendimento de 11%, diluído em álcool cereal a 93,5% foi adquirido comercialmente no município de Canavieiras (15° 40' 30'' S e 38° 56' 50'' W), Bahia, Brasil. Para confirmar o rendimento do EHPV informado pelo fabricante, foi realizada a secagem de um volume conhecido do EHPV por evaporação em capela de exaustão e, em seguida, o peso do extrato seco foi utilizado para calcular o rendimento.

2.2. Determinação do teor de fenóis totais

Foi determinado usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer & Lamuela-Raventós, 1999) com adaptações. 100 µL do EHPV (5 mg mL⁻¹) foi homogeneizado em 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu, 2 mL de carbonato de sódio (20% p/v) e 7,4 mL de água. Após 2 horas no escuro, a absorbância foi lida a 750 nm em espectrofotômetro digital (Tecnal UV-5100). O ácido gálico foi usado como padrão para calcular a curva de calibração $y = 0,1037x + 0,016$; $R^2 = 0,9972$. O teor de fenóis totais foi expresso em g de ácido gálico por 100g de própolis (m/m).

2.3. Conteúdo total de flavonóides

Foi determinado usando o método colorimétrico do cloreto de alumínio descrito por (Chang, Yang, Wen & Chern, 2002), com adaptações. O EHPV (50 µg mL⁻¹) foi homogeneizado com solução metanólica de AlCl₃ (20 mg mL⁻¹) e armazenada no escuro por 30 minutos, com leitura a 415 nm. A curva de calibração foi construída relacionando diferentes concentrações de rutina (0 – 100 µg mL⁻¹) com suas respectivas absorbâncias (y

= 0,014x + 0,0722; $R^2 = 0,9999$). Os resultados foram expressos em g de rutina por 100g de própolis (m/m).

2.4. Cromatografia gasosa/espectrometria de massa

A composição química do extrato foi determinada através da análise dos espectros de massas obtidos em espectrômetro modelo GCMS-QP2020, acoplado ao cromatógrafo a gás, modelo GC2010, ambos da Shimadzu, utilizando coluna capilar DB 5MS (30 m x 0,25 mm e 0,25 μm de espessura de filme), com taxa de fluxo da fase móvel (He) ajustada em 1,8 mL min^{-1} , temperatura do injetor de 280 °C e programação do forno de 60 °C a 280 °C com taxa de aquecimento de 10 °C por minuto, permanecendo a 280 °C até 35 minutos. A injeção foi realizada no modo pulsado sem divisão (111,5 kPa) e as temperaturas da fonte e da interface foram mantidas em 280 °C. Os espectros de varredura completa foram registrados de 37 a 660 m/z (massa/carga) com 2 varreduras por segundo.

2.5. Identificação dos componentes no extrato etanólico da própolis vermelha

Os compostos foram identificados com os padrões contidos no banco de dados das bibliotecas NIST08, Mainlib e Wiley7 e por comparação com os dados registrados na literatura (Ahmad & Jantan, 2003; Alencar et al., 2007; Awale et al., 2008; García, Sáenz, Ahumada & Cert, 1997; Khannoon et al., 2011) e por comparação dos índices de retenção, obtidos por meio da curva linear utilizando a serie homóloga de hidrocarbonetos C9-C40 como padrões, com os dados do índice de retenção linear obtidos na literatura científica para colunas da mesma polaridade, por meio da plataforma online Pherobase (www.pherobase.com/database/kovats/kovatsindex.php, acessado em 18 de novembro de 2019). A quantidade relativa dos componentes individuais foi expressa como área percentual do pico em relação à área total dos compostos identificados.

2.6. Determinação da atividade antioxidante

2.6.1. Ensaio de eliminação dos radicais livres DPPH

O ensaio foi realizado utilizando o método de Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995) com adaptações. O EHPV foi diluído em metanol (0,2-2 mg mL⁻¹), e 0,1 mL de cada diluição foi homogeneizado em 3,9 mL da solução metanólica do radical DPPH (0,06 mM). As soluções foram armazenadas no escuro por 30 minutos e a absorbância lida a 515 nm. A porcentagem de eliminação dos radicais livres foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% = \{(\text{Absorbância do controle} - \text{Absorbância da amostra}) / \text{Absorbância do controle}\} \times 100$$

A curva de calibração foi construída relacionando a concentração do EHPV com a porcentagem de inibição. Os resultados foram expressos em IC₅₀ (quantidade (mg mL⁻¹) do extrato necessário para eliminar 50% do DPPH).

2.6.2. Ensaio de eliminação dos radicais livres ABTS

O ensaio foi realizado por meio do método colorimétrico de captura do radical ABTS de acordo com Re et al. (1999), com adaptações. 30 µL do EHPV (200-1000 mg L⁻¹) foi homogeneizado em 3 mL de solução etanólica do radical ABTS previamente padronizada em 0,7 nm ± 0,05 nm a 734 nm. A mistura foi armazenada no escuro por 6 minutos e a absorbância lida a 734 nm. A solução etanólica de trolox (100-2000 µM) foi utilizada para construir a curva de calibração $y = -0,0003x + 0,6774$; $R^2 = 0,9927$. Os resultados foram expressos em µmol Trolox por g de própolis.

2.7. Atividade antimicrobiana

Foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com Wiegand, Hilpert & Hancock (2008). Em uma placa de microtitulação foi adicionado 100 µL de caldo Mueller-Hinton em todos os poços. Em seguida, 100 µL do EHPV a 110 mg mL⁻¹ foi

adicionado nos poços da primeira fileira da placa e realizado a diluição seriada. As concentrações do EHPV avaliadas variaram de 55 a 0,007 mg mL⁻¹. Posteriormente, as cepas padrões *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Vibrio parahaemolyticus* isolado de ostras, *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 e *Listeria monocytogenes* CERELA foram padronizadas em espectrofotômetro (Spectrum SP – 1105) a 625 nm até atingir a absorvância de 0,08-0,1 (10⁸ UFC mL⁻¹) e posteriormente essa solução foi diluída 1:10 para alcançar a concentração de 10⁷ UFC mL⁻¹. Em seguida, 5 µL da suspensão bacteriana de cada cepa foi inserida nos poços da placa. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após esse período, foi adicionado 20 µL do corante resazurina sódica (0,01%) em todos os poços e a placa foi novamente incubada por 3 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Foi considerada bactericida (CBM) a concentração do extrato que não permitiu a reativação do microrganismo em meio isento do extrato.

2.8. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e a correlação entre os compostos fenólicos totais e os métodos antioxidantes foi determinada pelo coeficiente de correlação de pearson ($p < 0,05$) usando o programa RStudio (RStudio Team, 2015).

3. Resultados e discussão

3.2. Identificação de compostos do EHPV por CG-EM

A Tabela 1 apresenta os compostos identificados no EHPV, o tempo de retenção, o índice de Kovats calculado, a área relativa e a classe de cada composto encontrado. Foram identificados 16 compostos químicos: 5 flavonoides, 4 triterpenos, 1 sesquiterpeno, 1

polifenol, 1 hidrocarboneto insaturado, 1 álcool insaturado, 1 éster, 1 benzopirano e 1 álcool saturado. A presença de isoflavonóides e terpenos também foi relatada em amostras de própolis vermelha brasileira provenientes do estado de Alagoas (Almeida et al., 2017). Os flavonoides foram a principal classe química encontrada, porém os triterpenos representaram no total maior porcentagem de área relativa (47,67%) indicando maior proporção.

Tabela 1. Compostos identificados no extrato hidroalcoólico da própolis vermelha por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

TR (min)	IK	Identificação	Área Relativa (%)	Classe
8,011	1157	Catechol	6,27	Polifenol
10,347	1365	(Z)-2,6,10-trimetil- 1,5,9-undecatrieno	1,98	Hidrocarboneto insaturado
15,563	1832	E,Z-farnesol	2,35	Sesquiterpeno
17,21	2002	Ácido Hexadecanoico	0,67	Ácido insaturado
17,53	2036	Ethyl palmitato	0,35	Éster
22,772	2585	Medicarpin	6,43	Flavonoide
23,885	2697	7,4'- dimetoxi- 2' hidroxí-isoflavana	4,34	Flavonoide
24,5	2758	(3S) vestitol	16,5	Flavonoide
24,667	2775	(3S) isovestitol	6,73	Flavonoide
24,745	2782	2H-1-benzopiran-7-ol	0,8	Benzopirano
25,151	2822	Formononetina	1,33	Flavonoide
32,262	3395	Dotriacontan-1-ol	4,58	Álcool saturado
34,001	3490	Amirina	23,29	Triterpeno
35,108	3538	Cycloartenol	1,21	Triterpeno
35,259	3543	Lupeol	2,91	Triterpeno
38,129	3614	Acetato de lupeol	20,26	Triterpeno

TR: Tempo de retenção (minutos); IK: índice de kovats calculado; IK**: índice de kovats da literatura. Área relativa (%): corresponde a área relativa dos metabólitos identificados.

Dos compostos identificados, os triterpenos pentacíclicos amirina e acetato de lupeol foram os de maiores proporções. Rushdi et al. (2014) também detectaram a presença de amirina na própolis da Etiópia em elevada proporção, indicando que os triterpenóides provavelmente são componentes dominantes de amostras de própolis de regiões tropicais. Estes compostos têm sido relatados como agentes antibacterianos, antitumorais e antioxidantes (Ishida, Negri, Salatino & Bandeira, 2011; Shirwaikar, Setty & Bommu, 2004; Simone-Finstrom & Spivak, 2010). Atividade antioxidante e anti-inflamatória também foi atribuída ao triterpeno lupeol (Fernández, Heras, García, Saéns & Villar, 2001; Shirwaikar, Setty & Bommu, 2004). Os triterpenos pentacíclicos são componentes naturais de dietas humanas e são encontrados em óleos, vegetais, cereais, frutas e verduras (Silva, Duarte & Vieira Filho, 2014).

Os compostos formononetina, medicarpin e vestitol identificados são considerados marcadores químicos da própolis vermelha. Esses compostos foram encontrados em extratos cubanos e brasileiros (Cuesta-Rubio et al., 2007; Mendonça et al., 2015). Entre os flavonoides identificados no EHPV, o (3S) vestitol foi o composto mais abundante, seguido de isovestitol e (3S) medicarpin (Tabela 1, Figura 1). A bioatividade da própolis é comumente associada a ação dos flavonoides. De fato, esta classe química tem mostrado importantes efeitos farmacológicos, como atividade antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante (Awale et al., 2008; Trusheva et al., 2006). Oldoni et al. (2011) observaram que o composto vestitol isolado da própolis vermelha no Estado de Alagoas, Brasil, apresentou elevada atividade antioxidante. Já o flavonoide formononetina, isolado da própolis vermelha do Estado de Pernambuco, Brasil, tem atuação fungicida conhecida contra *Candida* spp. (Neves, Silva, Lima, Cunha & Oliveira, 2016) e antitumoral contra câncer de próstata em camundongos (Li et al., 2014).

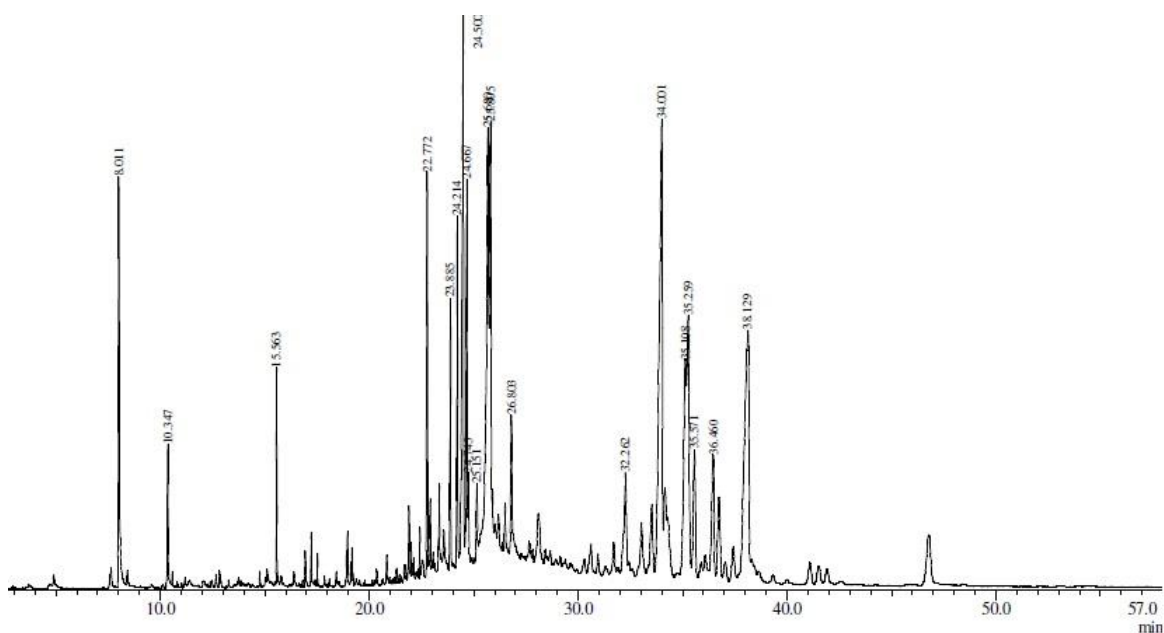


Figura 1. Cromatograma da análise do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

3.1. Composição fenólica

O EHPV apresentou elevado teor de fenóis e flavonóides, acima do mínimo recomendado pela legislação brasileira de 0,5% e 0,25% respectivamente (Brasil, 2001), se destacando em relação aos extratos de própolis vermelha de diferentes regiões (Tabela 2). De fato, o conteúdo de fenóis totais determinado no presente trabalho foi superior ao quantificado por Andrade et al. (2017) no extrato da própolis vermelha (9,13%) provenientes do Estado de Alagoas, nordeste do Brasil. Já o conteúdo de flavonóides, foi superior ao encontrado por Siqueira et al. (2014) na própolis vermelha (1,87%) proveniente do Estado de Sergipe, Brasil.

Tabela 2. Conteúdo fenólico e atividade antioxidante do extrato da própolis vermelha, proveniente do estado da Bahia, Brasil.

Variáveis químicas	Média ± desvio padrão	Legislação*
<i>Conteúdo fenólico</i>		
Fenóis totais (%)	10,37 ± 0,15	Mínimo de 0,5%
Flavonóides totais (%)	3,53 ± 0,14	Mínimo de 0,25%
<i>Atividade antioxidante</i>		
Sequestro do radical DPPH (IC ₅₀ mg mL ⁻¹)	1,4 ± 0,01	-
Sequestro do radical ABTS (µM Trolox g ⁻¹ de própolis)	1638,56 ± 26,50	-

* (Brasil, 2001).

A composição fenólica específica da própolis é altamente dependente da vegetação ao redor da colmeia e das condições climáticas, bem como do método de extração, uma vez que o tempo de extração e o solvente utilizado afetam o rendimento do extrato da própolis. (Escriche & Juan-Borrás, 2018; Regueira Neto et al., 2017). O estado da Bahia, especialmente o Sul, é uma região com grande concentração de manguezais favoráveis a produção de própolis, onde a *D. ecastaphylum*, principal origem botânica da própolis vermelha é comumente encontrada (Costa et al., 2013).

3.3. Atividade antioxidante

A concentração do EHPV necessária para eliminar 50% dos radicais DPPH foi elevada, equivalente a 1,4 mg mL⁻¹ do EHPV, sendo que, quanto maior essa concentração, menor é a atividade antioxidante (Tabela 2). De fato, esse resultado foi superior aos relatados

por Silva et al. (2018) no extrato etanólico de própolis vermelha do Estado de Alagoas, Brasil (0,00397 mg mL⁻¹), por Araújo et al. (2016) no extrato etanólico de própolis do Estado de Tocantins, Brasil (0,85 mg mL⁻¹) e por Miguel, Nunes, Dandlen, Cavaco & Antunes, (2014) no extrato metanólico de própolis do sul de Portugal (0,007-0,069 mg mL⁻¹).

Por outro lado, a atividade antioxidante do EHPV determinada pelo método ABTS (Tabela 2) foi melhor que o encontrado por Osés, Pascual-Maté, Fernández-Muiño, López-Díaz & Sancho (2016) no extrato de própolis da Espanha (1400,86 µM trolox g⁻¹), mas inferior ao observado por Andrade et al. (2017) nos extratos de própolis verde (2214,96 µM trolox g⁻¹), marrom (1868,45 µM trolox g⁻¹) e vermelha (2913,55 µM trolox g⁻¹) obtidas no Nordeste do Brasil.

Para avaliar o grau de associação entre os compostos fenólicos quantificados e a atividade antioxidante detectada, os métodos (fenóis, flavonóides e ABTS) foram comparados pelo coeficiente de correlação de Pearson (r), que mede a relação entre duas variáveis quantitativas (Tabela 3).

A atividade antioxidante da própolis é comumente atribuída aos compostos fenólicos, especialmente aos flavonóides (Oldoni et al., 2011). No entanto, o coeficiente de correlação de Pearson mostrou forte correlação negativa entre fenóis, flavonóides e o método ABTS (Tabela 3), corroborando com os achados de Andrade et al. (2017) ao analisarem o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante (DPPH e ABTS) da própolis vermelha. Este resultado sugere que a capacidade antioxidante total do EHPV está relacionada a outros compostos e não diretamente à classe de flavonóides. É provável que a presença abundante de triterpenos detectada na análise cromatográfica seja responsável pela atividade antioxidante no EHPV, uma vez que esses compostos já foram relacionados a eliminação de radicais livres (Shirwaikar, Setty & Bommu, 2004).

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Pearson do conteúdo total de fenóis, flavonóides e atividade antioxidante (ABTS).

Parâmetros	Flavonóides	Fenóis	ABTS
Flavonóides	1	0,9955	-0,6842
Fenóis		1	-0,6116
ABTS			1

3.4. Atividade antimicrobiana

O EHPV apresentou melhor atividade bacteriostática contra *L. monocytogenes* e *E. faecalis* (Tabela 4). Esse resultado é relevante uma vez que *L. monocytogenes* está associada a septicemia, abortos e até a morte em indivíduos infectados (Carvalho, Paula, Mantovani, & Moraes, 2006) e *E. faecalis* à infecções humanas e à resistência a antimicrobianos (Terra Costa, Mucinhato, Furlaneto & Furlaneto-Maia, 2018). Similar atividade antibacteriana contra *E. faecalis* também foi relatada por Lopez et al. (2015) no extrato da própolis vermelha da Paraíba, Brasil.

Por outro lado, a melhor atividade bactericida do EHPV foi observada para *S. aureus* e *V. parahaemoliticus* (Tabela 4). As demais bactérias avaliadas, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes* e *E. faecalis*, foram eliminadas pelo EHPV na concentração de 55 mg mL⁻¹, corroborando com os resultados obtidos por Tiveron et al. (2016) que observaram uma concentração bactericida do extrato da própolis brasileira contra *E. coli* de >1,6 mg mL⁻¹. Divergindo dos resultados encontrados, Lopez et al. (2015), analisando extrato comercial de própolis vermelha de diferentes estados do Brasil verificaram que o extrato proveniente de Sergipe inibiu *E. coli* a 0,01 mg mL⁻¹ e o proveniente de Alagoas inibiu *S. aureus* a 0,025 mg mL⁻¹. As diferenças observadas na atividade antibacteriana dos extratos de própolis podem ser explicadas pelas diferenças na composição química da própolis, como também

pelas diferentes concentrações dos compostos químicos, uma vez que esse produto é resultado de uma mistura complexa e variada de substâncias coletadas de diversas espécies vegetais.

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha.

Microrganismo	Própolis vermelha	
	CIM (mg mL ⁻¹)	CBM (mg mL ⁻¹)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,56	3,12
<i>Escherichia coli</i>	6,88	55
<i>Salmonella enteritidis</i>	6,88	55
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1,72	3,44
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,05	55
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,10	55

Todos os patógenos Gram-positivos testados foram suscetíveis a concentrações mais baixas do EHPV do que os Gram-negativos (Tabela 4). Esse fato é resultado das diferenças estruturais na parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Enquanto Gram negativos apresentam uma parede composta de uma camada de peptidoglicano e uma membrana externa lipopolissacarídica, os Gram-positivos possuem apenas uma fina camada de peptidoglicano e mostrando menos resistentes aos agentes antibacterianos (Araújo et al., 2010).

Embora os mecanismos de ação da própolis não estejam completamente elucidados, sabe-se que seus compostos podem atuar aumentando a permeabilidade da membrana plasmática da bactéria e conseqüentemente anulando seu potencial, diminuindo a produção

de ATP, sua mobilidade e o transporte de membrana, além de inibir a síntese de ácidos nucleicos, a divisão celular e a formação de biofilme (Freires, de Alencar & Rosalen, 2016; Xie, Yang, Tang, Chen & Ren, 2014).

Estudos anteriores relataram atividade antibacteriana de compostos fenólicos e triterpenos contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas (Almeida et al., 2017; Trusheva et al., 2006). Portanto, acredita-se que a atividade antibacteriana observada no EHPV seja resultado de um efeito sinérgico entre flavonoides, triterpenos e outros compostos orgânicos, especialmente medicarpin, (3S) vestiol, (3S) isovestiol, amirina e acetato de lupeol verificados em maior abundância na própolis estudada.

Sendo assim, devido as propriedades antibacterianas e antioxidantes, o EHPV apresenta potencial como conservante natural na promoção da estabilidade microbiana e oxidativa de vários produtos alimentares.

4. Conclusões

A rica composição em flavonoides e triterpenos do tipo pentacíclicos, bem como atividade antioxidante e antibacteriana observada no EHPV do Estado da Bahia, Brasil, revela potencial para utilização na conservação e produção de alimentos funcionais. Estudos futuros são necessários para avaliar a atividade biológica de triterpenos isolados como também a influência da própolis nas características sensoriais de produtos alimentícios.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- Ahmad, FB, & Jantan, IB (2003). Chemical constituents of the essential oils of *Goniothalamus uvarioides* King. *Flavour and Fragrance Journal*, 18 (2), 128–130.
- AL-Ani, I, Zimmermann, S, Reichling, J, & Wink, M (2018). Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*, 5 (1), 2.
- Alencar, SM, Oldoni, TLC, Castro, ML, Cabral, ISR, Costa-Neto, CM, Cury, JA, Rosalen, PL, Ikegaki, M (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, 113 (2), 278–283.
- Almeida, ETC, Silva, MCD, Oliveira, JMS, Kamiya, RU, Arruda, RES, Vieira, DA, Silva, VC, Escodro, PB, Basílio-Júnior, ID, Nascimento, TG (2017). Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7 (5), 280–287.
- Andrade, JKS, Denadai, M, Oliveira, CS, Nunes, ML, & Narain, N (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 101 (1), 129–138.
- Araújo, EA, Andrade, NJ, Carvalho, AF, Ramos, AM, Silva, CAS, & Silva, LHM (2010). Aspectos coloidais da adesão de micro-organismos. *Química Nova*, 33 (9), 1940–1948.
- Araújo, KSS, Santos Júnior, JF, Sato, MO, Finco, FDBA, Soares, IM, Barbosa, RS, Alvin, TC, Ascêncio, SD, Mariano, SMB (2016). Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (*Meliponinae*) and Apis from two regions of Tocantins, Brazil. *Acta Amazonica*, 46 (1), 61–68.

- Awale, S, Li, F, Onozuka, H, Esumi, H, Tezuka, Y, & Kadota, S (2008). Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16 (1), 181–189.
- Brand-Williams, W, Cuvelier, ME, & Berset, C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1), 25–30.
- Brasil, Ministério da Agricultura e do abastecimento. (2001). *Regulamento técnico para fixação de entidade e qualidade de própolis* (Lei nº 3, de 19 de janeiro de 2001). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Carocho, M, Morales, P, & Ferreira, ICFR (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45 (2), 284–295.
- Carvalho, AAT, Paula, RA, Mantovani, HC, & Moraes, CA (2006). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiology*, 23 (3), 213–219.
- Chang, CC, Yang, MH, Wen, HM, & Chern, JC (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3), 178-182.
- Costa, AS, Machado, BAS, Umsza-Guez, MA, Cirqueira, MG, Nunes, SB, & Padilha, FF (2013). Levantamento dos estudos realizados com a própolis produzida no estado da Bahia. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, 13 (2), 123-130.

Cuesta-Rubio, O, Piccinelli, AL, Fernandez, MC, Hernández, IM, Rosado, A, & Rastrelli, L (2007). Chemical Characterization of Cuban Propolis by HPLC–PDA, HPLC–MS, and NMR: The brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (18), 7502–7509.

Escriche, I, & Juan-Borrás, M (2018). Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106 (1), 834–841.

Fernández, MA, Heras, B, García, MD, Saéns, MT, Villar, A (2001). New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53 (11), 1533-1539.

Freires, IA, Alencar, SM, & Rosalen, PL (2016). A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 110 (1), 267–279.

Freires, IA, Pinguero, JMS, Miranda, SLF, & Bueno-Silva, B (2018). Red Propolis: Phenolics, Polyphenolics, and Applications to Microbiological Health and Disease.

Watson, R. R., Preedy, V. R., Zibadi, S. (Ed.), *Polyphenols: Prevention and Treatment of Human Disease* (cap. 24; pp. 293–300). Cambridge: Academic Press.

García, MD, Sáenz, MT, Ahumada, MC, & Cert, A (1997). Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq. *Journal of Chromatography A*, 767 (2), 340–342.

Han, S, & Park, H (2002). Accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances in cured pork sausages treated with propolis extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (13), 1487–1489.

Hernández, F, Portolés, T, Pitarch, E, & López, FJ (2009). Searching for anthropogenic contaminants in human breast adipose tissues using gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 44 (1), 1–11.

Ishida, VFC, Negri, G, Salatino, A, & Bandeira, MFCL (2011). A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chemistry*, 125 (3), 966–972.

Khannoon, ER, Flachsbarth, B, El-Gendy, A, Mazik, K, Hardege, JD, & Schulz, S (2011). New compounds, sexual differences, and age-related variations in the femoral gland secretions of the lacertid lizard *Acanthodactylus boskianus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39 (2), 95–101.

Kunrath, CA, Savoldi, DC, Mileski, JPF, Novello, CR, Alfaro, AT, Marchi, JF, Tonial, IB (2017). Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20 (1), 1-10.

Li, T, Zhao, X, Mo, Z, Huang, W, Yan, H, Ling, Z, & Ye, Y (2014). Formononetin Promotes Cell Cycle Arrest via Downregulation of Akt/Cyclin D1/CDK4 in Human Prostate Cancer Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34 (4), 1351–1358.

Lopez, BGC, Lourenço, CC, Alves, DA, Machado, D, Lancellotti, M, & Sawaya, ACHF (2015). Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: An alert for its safe use. *Journal of Applied Microbiology*, 119 (3), 677–687.

Mendonça, ICG, Porto, ICCM, Nascimento, TG, Souza, NS, Oliveira, JMS, Arruda, RES, Mousinho, KC, Santos, AF, Basílio-Júnior, ID, Parolia, A, & Barreto, FS (2015). Brazilian red propolis: Phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15 (1), 1-12.

Miguel, MG, Nunes, S, Dandlen, SA, Cavaco, AM, & Antunes, MD (2014). Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera* L.) from Algarve, South Portugal. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34 (1), 16–23.

Neves, MVM, Silva, TMS, Lima, EO, Cunha, EVL, & Oliveira, EJ (2016). Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47 (1), 159–166.

Oldoni, TLC, Cabral, ISR., d'Arce, MABR, Rosalen, PL, Ikegaki, M, Nascimento, AM, & Alencar, SM (2011). Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology*, 77 (2), 208–213.

Osés, SM, Pascual-Maté, A, Fernández-Muiño, MA, López-Díaz, TM, & Sancho, MT (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196 (1), 1215–1223.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (10), 1231–1237.

Regueira Neto, MS, Tintino, SR, Silva, ARP, Costa, MS, Boligon, AA, Matias, EFF, Balbino, VQ, Menezes, IRA, Coutinho, HDM (2017). Seasonal variation of Brazilian red

propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, 107 (1), 572–580.

Rstudio team (2015). RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston.

Recuperado em <http://www.rstudio.com>, 2015.

Rushdi, AI, Adgaba, N, Bayaqaob, NIM., Al-Khazim, A, Simoneit, BRT, El-Mubarak, AH, & Al-Mutlaq, KF (2014). Characteristics and chemical compositions of propolis from Ethiopia. *SpringerPlus*, 3 (1), 76-85.

Savoldi, DC, Kunrath, CA, Oliveira, DF, Novello, CR, Coelho, AR, Marchi, JF, & Tonial, IB (2019). Características físicas e sensoriais de Salame Tipo Italiano com adição de própolis. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 18 (2), 212–221.

Shirwaikar, A, Setty, MM, Bommu, P, & Krishnanand, B (2004). Effect of lupeol isolated from *Crataeva nurvala* Buch.-Ham. stem bark extract against free radical induced nephrotoxicity in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 42 (7), 686-690.

Silva, BB, Rosalen, PL, Cury, JA, Ikegaki, M, Souza, VC, Esteves, A, Alencar, SM (2008). Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 5 (3), 313-316.

Silva, FC, Duarte, LP, Vieira Filho, SA (2014). Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. *Revista Virtual de Química*, 6 (5), 1205-1220.

Silva, FRG, Matias, TMS., Souza, LIO., Matos-Rocha, TJ, Fonseca, SA, Mousinho, KC, & Santos, AF (2018). Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. *Brazilian Journal of Biology*, 79 (3), 452–459.

Silva, UF, Borba, EB, Semir, J, & Marsaioli, AJ (1999). A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (*Orchidaceae*) volatiles. *Phytochemistry*, 50 (1), 31–34.

Simone-Finstrom, M, & Spivak, M (2010). Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*, 41 (3), 295–311.

Singleton, VL, Orthofer, R, & Lamuela-Raventós, RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299 (1), 152–178.

Siqueira, AL, Dantas, CG, Gomes, MZ, Padilha, FF, Albuquerque Junior, RLC, & Cardoso, JC (2014). Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. *Revista de Odontologia da UNESP*, 43 (6), 359–366.

Terra, MR, Costa, LC, Mucinhato, RMD, Furlaneto, MC, & Furlaneto-Maia, L (2018). Alimento como potencial reservatório de *Enterococcus* que albergam determinantes de virulência a resistência. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, 22 (1), 86–93.

Tiveron, AP, Rosalen, PL, Franchin, M, Lacerda, RCC, Bueno-Silva, B, Benso, B, Denny, C, Ikegaki, M, Alencar, SM (2016). Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. *Plos One*, 11 (11), 1-18.

Trusheva, B, Popova, M, Bankova, V, Simova, S, Marcucci, MC, Miorin, PL, Pasin, FR, Tsvetkova, I (2006). Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3 (2), 249–254.

Wang, X, Sankarapandian, K, Cheng, Y, Woo, SO, Kwon, HW, Perumalsamy, H, & Ahn, YJ (2016). Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *Complementary and Alternative Medicine*, 16 (1), 1-12.

Wiegand, I, Hilpert, K, & Hancock, REW (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3 (2), 163–175.

Xie, Y, Yang, W, Tang, F, Chen, X, & Ren, L (2014). Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22 (1), 132–149.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA DE UMA CULTURA *STARTER* COMERCIAL

Food Science and Technology

Caracterização probiótica de uma cultura *starter* comercial

Probiotic characterization of commercial starter culture

Jéssica Ferreira Mafra^{1,8}, Alexsandra Iarlen Cabral Cruz^{2,8}, Tiago Sampaio de Santana^{3,8},
Mariza Alves Ferreira^{4,8}, Floricea Magalhães Araújo^{5,7}, Norma-Suely Evangelista-
Barreto^{7,8}

¹Mafra, JF. E-mail: jelmafra@hotmail.com.

²Cruz, AIC. E-mail: iarlen007@gmail.com

³Santana, TS. E-mail: tiagosampaio20@hotmail.com

⁴Ferreira, MA. E-mail: marisaufrb@yahoo.com.br

⁵Araújo, FM. E-mail: floriceaaraujo@gmail.com

⁶Evangelista-Barreto, NS. E-mail: nsevangelista@yahoo.com.br. Fone: 75.3621-1558

⁷Universidade Federal da Bahia – UFBA, Rua Barão de Geremoabo S/N, Ondina, CEP 40015-030, Salvador, BA, Brasil.

⁸Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Rua Rui Barbosa, 710, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.

Resumo

Este estudo investigou o potencial probiótico de uma cultura *starter* comercial usada na fermentação de embutidos cárneos. A cultura *starter* composta por *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* e *S. carnosus* foi avaliada quanto a resistência aos antimicrobianos ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina, imipinem, nitrofurantoina, tetraciclina e vancomicina; capacidade antagônica (*Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Vibrio parahaemolyticus* isolado de ostras, *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 e *Listeria monocytogenes* CERELA); resistência a baixos valores de pH e sais biliares; produção de gás, cápsula e capacidade de acidificação; crescimento em diferentes valores de pH, temperaturas e sais de cura. A cultura *starter* foi suscetível a todos os antimicrobianos testados, inibindo fortemente os patógenos testados com halos de inibição superiores a 30 mm. A cultura *starter* foi resistente a altas concentrações de sais biliares (0; 0,3; 0,5 e 0,7%), não produziu gás nem cápsula, crescendo de 15° a 35 °C e em meio contendo cloreto de sódio e os sais de cura nitrito e nitrato. No entanto, não foi capaz de resistir a baixos valores de pH indicando não apresentar tolerância a acidez estomacal. Apesar da cultura *starter* apresentar características probióticas, a não tolerância a baixos valores de pH impede sua classificação como cultura probiótica.

Palavras-chave: antagonismo, caracterização funcional, sais biliares, suscetibilidade antimicrobiana.

1. Introdução

Culturas *starters* ou culturas iniciadoras são microrganismos viáveis que se desenvolvem pela fermentação de substratos presentes no meio. São comumente empregadas com a finalidade de melhorar a segurança do produto por meio do controle de patógenos por competição, prolongar a vida útil do produto inibindo microrganismos deteriorantes e modificar o alimento para obter novas propriedades sensoriais (Farnworth & Champagne, 2016).

Apesar da cultura *starter* fornecer benefícios aos alimentos, os consumidores estão, cada vez mais, buscando alimentos funcionais que além de sua função nutricional básica, podem, por exemplo, reduzir o risco de doenças crônicas e degenerativas (Tripathi & Giri, 2014). A grande procura por alimentos mais saudáveis tem incentivado pesquisadores e o setor de processamento de carnes a desenvolverem novos produtos com características funcionais. Neste cenário muitas ideias surgiram para atrair os consumidores, como a utilização de culturas probióticas em produtos cárneos fermentados como embutidos (Trzaskowska, Kołożyn-Krajewska, Wójciak & Dolatowski, 2014).

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, melhorando a digestão, fortalecendo o sistema imunológico e aumentando a absorção de nutrientes (Fao & Who, 2002). Atualmente, os produtos lácteos são os principais veículos alimentares de probióticos, no entanto, estudos também demonstram viabilidade na elaboração de produtos de carne fermentados com culturas probióticas como o salame (Pavli, Argyri, Chorianopoulos, Nychas & Tassou, 2020).

Considerando a importância da adição de culturas *starter* probióticas na produção de alimentos funcionais, este estudo teve como objetivo verificar o potencial probiótico de uma cultura *starter* comercial comumente utilizada na produção de embutidos fermentados.

2. Material e métodos

2.1. Cultura starter e condições de crescimento

A cultura *starter* composta por *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* e *Lactobacillus sakei* liofilizada foi adquirida comercialmente e avaliada suas características probióticas. A cultura *starter* foi ativada em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e inoculada em ágar MRS e ágar Baird-Parker para o crescimento das três espécies de microrganismos. A confirmação do crescimento das espécies presentes na cultura *starter* foi realizada por meio das características morfológicas e testes bioquímicos de fermentação dos carboidratos arabinose, sacarose, maltose e xilose. Posteriormente, a cultura *starter* foi ativada em caldo MRS a 37 °C por 24 h, centrifugada (10.000 x g por 10 min a 4°C), lavada duas vezes em água peptonada (0,1%) e estocada em meio suplementado com 20% de glicerol a -20°C (Kongkiattikajorn, 2015).

2.2. Caracterização probiótica da cultura starter

2.2.1. Resistência aos antimicrobianos

A resistência da cultura *starter* aos antimicrobianos ampicilina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), imipinem (10 µg), nitrofurantoina (300 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) foi determinada pelo método de disco-difusão de acordo com as recomendações do Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST, 2017). Os discos foram adicionados na superfície do ágar MRS e as placas incubadas a 37 °C por 24 h em anaerobiose. Os resultados foram expressos como sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) de acordo com os padrões recomendados por Acar & Goldstein (1991).

2.2.2. Atividade antagônica

A cultura *starter* foi ativada em caldo MRS e incubada a 37 °C por 24 h. Alíquotas de 5 µL foram inoculadas em placas contendo ágar MRS e incubadas por 24 h a 37 °C. Em seguida, uma sobrecamada de ágar Brain Heart Infusion (BHI) contendo separadamente as culturas indicadoras (*Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 e *Listeria monocytogenes* CERELA) foram adicionadas na superfície das placas e incubadas novamente por 24 h a 37 °C. A atividade antimicrobiana foi observada pela formação de um halo de inibição contra as culturas indicadoras (Mishra & Prasad, 2005).

2.2.3. Determinação da resistência a baixos valores de pH e sais biliares

A resistência da cultura *starter* a baixos valores de pH e aos sais biliares foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Muñoz-Quezada et al. (2013) com adaptações. 900 µL de caldo MRS com diferentes valores de pH (2; 2,5; 3 e 7) e diferentes concentrações de sais biliares (0; 0,3; 0,5 e 0,7%) foram inoculados com 100 µL da cultura *starter* padronizada a 10⁸ UFC mL⁻¹. Posteriormente, 100 µL de cada tratamento foram diluídos em água peptonada (0,1%) nos tempos 0; 0,5; 1; 1,5 e 2 h e 10 µL de cada diluição plaqueados em ágar MRS. A contagem das colônias foi realizada após 48 h de incubação anaeróbica a 37 °C.

2.2.4. Produção de gás, capacidade de acidificação e produção de cápsula

A produção de gás e a capacidade de acidificação foram determinadas de acordo com Greco, Mazzette, Santis, Corona & Cosseddu (2005). A produção de cápsula foi avaliada de

acordo com Hitchener, Egan & Rogers (1982), por meio da coloração negativa pelo método de Gins.

2.2.5. Crescimento em diferentes valores de pH e temperaturas

Foi verificada a capacidade de crescimento da cultura *starter* em pH ajustado para 3, 4, 5 e 6 com ácido clorídrico ($\text{HCl } 5 \text{ mol L}^{-1}$) (Papamanoli, Tzanetakis, Litopoulou-Tzanetaki & Kotzekidou, 2003) e nas temperaturas de 4 °C, 15 °C, 25 °C, 35 °C e 45 °C (Drosinos et al., 2005).

2.2.6. Sensibilidade a diferentes concentrações de cloreto de sódio sal e aos sais de cura nitrito e nitrato de sódio

A cultura *starter* foi testada quanto à resistência ao cloreto de sódio adicionado ao ágar MRS nas concentrações de 1,5%, 2,5% e 3,0% por meio da semeadura em superfície. Os testes de resistência ao nitrito e nitrato de sódio foi realizado pelo mesmo procedimento utilizando as concentrações de 100, 120, 150 e 100, 200, 300 ppm, respectivamente (Arihara & Itoh, 2000).

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização probiótica da cultura starter

3.1.1. Suscetibilidade aos antimicrobianos

A cultura *starter* foi suscetível a todos os antimicrobianos testados. Resultados contrários foram obtidos por Ayyash et al. (2018) em que diferentes espécies de *Lactobacillus* isolados de leite apresentaram resistência a eritromicina, vancomicina e ampicilina. A suscetibilidade antimicrobiana aos antimicrobianos é uma característica

desejável em culturas probióticas uma vez que não contribuem para a transmissão de genes de resistência a patógenos (Tripathi & Giri, 2014).

3.1.2. Atividade antagônica

A cultura *starter* inibiu todos os patógenos testados, apresentando halos de inibição superiores a 30,25 mm, com maior influência inibidora contra as bactérias Gram-positivas *L. monocytogenes* e *S. aureus* (Tabela 1). Esse resultado foi melhor que o encontrado por Mishra & Prasad (2005) utilizando *L. casei* spp. isolados de produtos lácteos. A atividade antimicrobiana observada provavelmente é resultado de um conjunto de mecanismos de ação, como a redução do pH por meio da produção de compostos ácidos, como o ácido láctico ou bacteriocinas, ou por meio da competição por nutrientes (Tripathi & Giri, 2014).

Tabela 1. Média dos valores dos halos de inibição (mm) da cultura *starter* frente aos patógenos alimentares.

Patógenos	Zonas de inibição (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	36,02
<i>Escherichia coli</i>	31,18
<i>Enterococcus faecalis</i>	30,75
<i>Salmonella enteritidis</i>	30,25
<i>Listeria monocytogenes</i>	37,33

3.1.3. Resistência a baixos valores de pH

Os resultados do crescimento da cultura *starter* a diferentes pH (2, 2,5, 3 e 7) são apresentados na Figura 1. A cultura *starter* não foi capaz de sobreviver em pH 2. Em pH 2,5 a cultura só resistiu ao tempo 0 (5,73 log UFC mL⁻¹), e em pH 3 resistiu até 30 minutos de incubação (3,84 log UFC mL⁻¹). Em pH 7, a viabilidade da cultura não foi afetada, mesmo

após 2 horas ($7,10 \log \text{ UFC mL}^{-1}$) (Figura 1). Para ser considerada probiótica, uma cultura deve ser capaz de sobreviver em condições ácidas e manter a população de bactérias durante duas horas de trânsito no estômago (Kandyliis, Pissaridi, Bekatorou, Kanellaki & Koutinas, 2016). Jacobsen et al. (1999) relataram que de 44 cepas de *Lactobacillus* spp. testadas, 16 não sobreviveram ao pH 2,5. Papamanoli et al. (2003) também observaram ausência de crescimento em pH 3 em 100% de cepas isoladas de salame. De acordo com Muñoz-Quezada et al. (2013) a tolerância de *Lactobacillus* spp. ao ácido é altamente dependente da espécie e da linhagem.

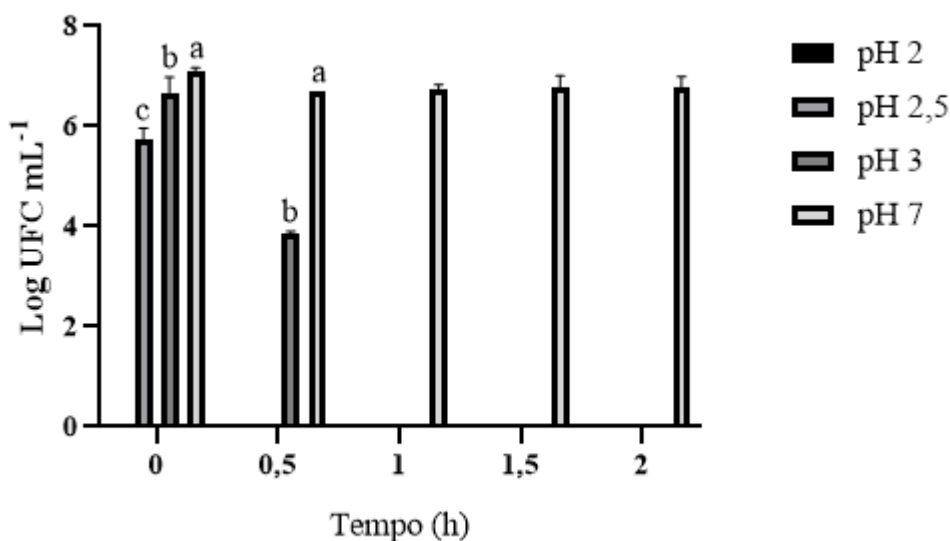


Figura 1. Crescimento da cultura *starter* comercial em baixos valores de pH por 2 horas. Médias acompanhadas pela mesma letra, no mesmo tempo, não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

3.1.4. Resistência a diferentes valores de sais biliares

No tempo 0, o tratamento controle (0% de sais biliares) ($7,42 \log \text{ UFC mL}^{-1}$) não diferiu ($p > 0,05$) do tratamento contendo 0,3% de sais biliares ($7,18 \log \text{ UFC mL}^{-1}$), mas

diferindo ($p < 0,05$) dos tratamentos 0,5% ($7 \log \text{UFC mL}^{-1}$) e 0,7% ($7,01 \log \text{UFC mL}^{-1}$) de sais biliares, demonstrando perda da viabilidade da cultura nessas concentrações (Figura 2).

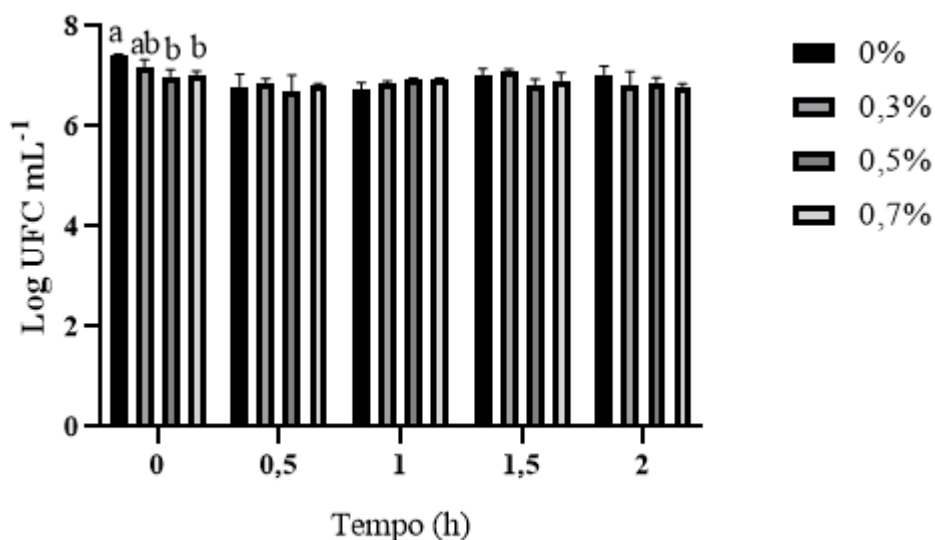


Figura 2. Crescimento da cultura *starter* comercial em diferentes concentrações de sais biliares por 2 horas.

Médias acompanhadas pela mesma letra, no mesmo tempo, não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A partir de 0,5 h, nenhum tratamento diferiu ($p > 0,05$) do controle, mesmo após 2 horas de incubação (Figura 2). Han, Kong, Chen, Sun & Zhang (2017) também verificaram elevada tolerância de *Lactobacillus* spp. isolados de embutidos aos sais biliares. Os sais biliares são importantes no mecanismo de defesa do intestino com concentrações fisiológicas normais variando de 0,3 a 0,5% (Muñoz-Quezada et al., 2013). No presente estudo, a cultura *starter* exibiu forte resistência aos sais biliares em concentrações de até 0,7% de sais biliares. A adaptação aos sais biliares está relacionada a alterações na atividade da glicosidase, produção de exopolissacarídeos, fermentação de carboidratos, composição de proteínas da

membrana e ácidos graxos, aumento da adesão ao muco humano e inibição da adesão de patógenos (Muñoz-Quezada et al., 2013).

3.1.5. Características tecnológicas

A cultura *starter* não produziu gás nem cápsula. Em embutidos, o uso de culturas *starter* não produtoras de gás é desejável uma vez que a produção de gás está associada a formação de cavidades no interior desses alimentos (Buckenhiiskes 1993). Ainda segundo o autor, a produção de cápsula é positiva para alguns alimentos fermentados, embora possa contribuir de forma negativa durante o processamento de embutidos, principalmente durante o fatiamento, pois microrganismos encapsulados podem se aderir aos equipamentos e ser fonte de contaminação para outros produtos.

Para uma cultura *starter* ser considerada probiótica, também deve ser resistente às condições do alimento. No caso de embutidos fermentados como o salame, as culturas devem ser capazes de acidificar o meio e sobreviver a diferentes temperaturas e a presença de sais de cura (Tripathi & Giri, 2014).

A cultura *starter* foi capaz de reduzir o pH do meio de 7 para 4,88 após 48 h de incubação. A rápida acidificação é uma característica importante de culturas utilizadas na fabricação de salames pois ocasiona uma ligeira queda do pH da massa cárnea, dando estabilidade ao produto (Kunrath et al., 2017).

A cultura *starter* apresentou capacidade de crescimento em 15°, 25° e 35°C, característica importante em culturas fermentadoras de salame, pois esse intervalo de temperatura é comumente utilizado no processo de produção de embutidos cárneos fermentados. A utilização de aditivos químicos pode afetar drasticamente o crescimento e a viabilidade de culturas *starter*, representando um desafio às bactérias probióticas na fermentação da carne (Tripathi & Giri, 2014). No entanto, a cultura *starter* avaliada

apresentou capacidade de crescimento tanto em meio com adição de cloreto de sódio a 1,5, 2,5 e 3%, como em meio contendo nitrito a 100, 120 e 150 ppm e nitrato a 100, 200 e 300 ppm.

4. Conclusão

Embora a cultura *starter* comercial avaliada no presente trabalho apresente a maioria das características necessárias para um para um probiótico, esta não pode ser considerada probiótica devido a não tolerância a acidez estomacal. Estudos futuros devem se concentrar em elucidar a resistência da microencapsulação de culturas *starters* suscetíveis a baixos valores de pH, pois esse conhecimento pode direcionar o desenvolvimento de novos produtos funcionais.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

Acar, JF, & Goldstein, FW (1991). Disk susceptibility test. Lorian, V (Ed.), *Antibiotics in Laboratory Medicine* (cap. 2; pp. 17-52). New York: Williams & Wilkins.

Arihara, K, & Itoh, M (2000). UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 56 (3), 227–230.

Ayyash, M, Abushelaibi, A, Al-Mahadin, S, Enan, M, El-Tarabily, K, & Shah, N (2018). In-vitro investigation into probiotic characterisation of *Streptococcus* and *Enterococcus* isolated from camel milk. *LWT – Food Science and Technology*, 87 (2), 478–487.

Drosinos, EH, Mataragas, M, Xiraphi, N, Moschonas, G, Gaitis, F, & Metaxopoulos, J (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 69 (2), 307–317.

Fao - Food and Agriculture Organization of the United Nations, & Who – World Health Organization (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Canadá: London Ontario. Recuperado em:

http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

Farnworth, ER, & Champagne, CP (2016). Production of Probiotic Cultures and Their Incorporation into Foods. Watson, RR, Preedy, VR (Ed.), *Bioactives Foods in Promoting Health* (cap 1; pp. 303–318). Cambridge: Academic Press.

Greco, M, Mazzette, R, Santis, EPL, Corona, A, & Cosseddu, AM (2005). Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science*, 69 (4), 733–739.

Han, Q, Kong, B, Chen, Q, Sun, F, & Zhang, H (2017). In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. *Journal of Functional Foods*, 32 (1), 391–400.

- Hitchener, BJ, Egan, AF, & Rogers, PJ (1982). Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. *Journal of Applied Bacteriology*, 52 (1), 31–37.
- Jacobsen, CN, Nielsen, VR., Hayford, AE, Møller, PL, Michaelsen, KF, Tvede, M, & Jakobsen, M (1999). Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied environmental microbiology*, 65 (4), 8-17.
- Kandyli, P, Pissaridi, K, Bekatorou, A, Kanellaki, M, & Koutinas, AA (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7 (2), 58–63.
- Kongkiattikajorn, J (2015). Potential of starter culture to reduce biogenic amines accumulation in som-fug, a Thai traditional fermented fish sausage. *Journal of Ethnic Foods*, 2 (4), 186–194.
- Kunrath, CA, Savoldi, DC, Mileski, JPF, Novello, CR, Alfaro, AT, Marchi, JF, Tonial, IB (2017). Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20 (1), 1-10.
- Mishra, V, & Prasad, D (2005). Application of in vitro methods for selection of strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 103 (1), 109–115.
- Muñoz-Quezada, S, Chenoll, E, Vieites, JM, Genovés, S, Maldonado, J, Bermúdez-Brito, M, Llorente, GC, Matencio, E, Bernal, MJ, Romero, F, Suarez, U, Ramon, D, Gil, A (2013). Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and

Lactobacillus rhamnosus CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *British Journal of Nutrition*, 109 (2), 51–S62.

Papamanoli, E, Tzanetakis, N, Litopoulou-Tzanetaki, E, & Kotzekidou, P (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65 (2), 859–867.

Pavli, FG, Argyri, AA, Chorianopoulos, NG, Nychas, GJE, Tassou, CC (2019). Evaluation of *Lactobacillus plantarum* L125 strain with probiotic potential on physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of dry-fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology*, 51 (2), 211-221.

Tripathi, MK, & Giri, SK (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9 (2), 225–241.

Trzaskowska, M, Kołożyn-Krajewska, D, Wójciak, K, & Dolatowski, Z (2014). Microbiological quality of raw-fermented sausages with *Lactobacillus casei* LOCK 0900 probiotic strain. *Food Control*, 35 (1), 184–191.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E MICROBIOLÓGICA DE SALAME DE TILÁPIA CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA

LWT - Food Science and Technology

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E MICROBIOLÓGICA DE
SALAME DE TILÁPIA CONTENDO PRÓPOLIS VERMELHA

Jéssica Ferreira Mafra^a, Alessandra Iarlen Cabral Cruz^a, Tiago Sampaio de Santana^b,
Fabrício Mendes Miranda^d, Mariza Alves Ferreira^b, Floricea Magalhães Araújo^e, Norma
Suely Evangelista-Barreto^{a,b,c*}

^a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Rua Rui Barbosa, 710, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.

^b Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Programa de Pós-graduação em Ciência animal, Rua Rui Barbosa, 710, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.

^c Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Centro de Ciências Agrárias, Ambiental e Biológicas – CCAAB, Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura – NEPA, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.

^d Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Centro de Ciências Agrárias, Ambiental e Biológicas – CCAAB, laboratório de química, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil.

^e Universidade Federal da Bahia – UFBA, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Rua Barão de Geremoabo S/N, Ondina, CEP 40015-030, Salvador, BA, Brasil.

*Autor correspondente

E-mail: nsevangelista@yahoo.com.br (Norma Suely Evangelista-Barreto)

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV) nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do salame de tilápia. Para a elaboração do salame de tilápia inicialmente se determinou a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do EHPV frente a cultura *starter* se chegando as seguintes formulações: F1= 0,01% de BHT, F2= 0,2% de EHPV, F3= 0,4% de EHPV, F4= 0,6% de EHPV e F5= sem EHPV e BHT e realizado teste de aceitação. A partir da formulação aceita sensorialmente juntamente com as formulações F1 e F5 foi elaborado novo lote para a caracterização microbiológica (mesófilos, bactérias lácticas, *Staphylococcus* spp. e coliformes a 45°C) e físico-química (pH, atividade de água, cor, oxidação lipídica, bases voláteis, umidade, lipídios e perda de peso) nos intervalos de 0, 2, 4, 8 e 16 dias de maturação. A formulação mais aceita pelos provadores foi a F3. O EHPV inibiu a cultura *starter* na formulação F3, resultando em alteração no pH desse salame ao longo da maturação, mas não diferiu das formulações F1 e F5 após 16 dias. Os resultados mostraram que o EHPV retardou tanto a oxidação lipídica como o conteúdo de bases voláteis no salame. As formulações F1, F3 e F5 apresentaram valores de umidade, lipídios, atividade de água e perda de peso conforme limites preconizados pela legislação brasileira. Além disso, os valores dos parâmetros de cor L*, a* e b* foram maiores ($p < 0,05$) para a formulação F3 em relação as formulações F1 e F5. A utilização de EHPV a 0,4% como conservante natural é promissor na elaboração de salame de tilápia pois inibe a deterioração química e microbiana.

Palavras-chave: BHT, análise sensorial, oxidação lipídica, tempo de maturação.

1. Introdução

O salame é um embutido cárneo mundialmente consumido e sua aquisição tem aumentado ao longo dos anos. De fato, somente no Brasil, no período de 2008 a 2009, a aquisição familiar per capita de salame foi de 0,373 kg (IBGE, 2010), 52% superior ao período de 2002 a 2003 (IBGE, 2004). Porém, a utilização de aditivos químicos na produção de embutidos tipo salame é motivo constante de preocupação para os consumidores uma vez que a ingestão excessiva desses conservantes já foi relacionada com o desenvolvimento de câncer (Hernández, Portolés, Pitarch & López, 2009; Kubow, 1992).

No Brasil, apesar do uso de aditivos como BHT (butil hidroxitolueno) e sais de cura (nitrito e nitrato) ser permitido pela legislação de alimentos, a adição de extratos naturais com efeitos equivalentes em produtos cárneos, poderiam substituí-los, agregando valor ao produto sem comprometer a aceitação sensorial (Fernandes, Trindade, Lorenzo, Munekata & Melo, 2016). Diferentes extratos vegetais já foram usados em produtos cárneos como por exemplo os extratos de alecrim, de orégano e de própolis (Ribeiro et al., 2019).

Entre os extratos naturais estudados como alternativa aos conservantes, o extrato de própolis se destaca na proteção da qualidade química e microbiológica de diversos alimentos desde suco de laranja a embutidos (Savoldi et al., 2019; Yang, Wu, Huang & Miao, 2017). No Brasil existem vários tipos de própolis, mas a vermelha, oriunda principalmente da espécie vegetal *Dalbergia ecastaphyllum* L., vem chamando bastante atenção pela sua composição química rica em isoflavonóides e alta atividade antimicrobiana (Machado et al., 2016). Vários autores relataram diversificada atividade biológica da própolis (Frozza et al., 2013), inclusive quando adicionada a produtos cárneos (Kunrath et al., 2017). Embora uma extensa pesquisa tenha se concentrado em investigar a atividade biológica da própolis vermelha, o papel dessa resina em produtos cárneos fermentados permanece pouco compreendido.

Além disso, em virtude da maior conscientização e preocupação dos consumidores com a segurança alimentar e a alta demanda por dietas mais saudáveis, a elaboração de produtos à base de peixe é uma boa oportunidade para promover a ingestão benéfica de alimentos funcionais uma vez que essa matéria-prima contém gorduras saudáveis e vitaminas essenciais (Sousa & Almeida, 2018).

Considerando a importância da utilização de extratos naturais na conservação de produtos cárneos em substituição aos aditivos químicos e da produção de alimentos funcionais, este estudo teve como objetivo avaliar a influência do EHPV nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de um salame elaborado com carne de tilápia.

2. Material e métodos

2.1. Amostra de extrato de própolis

O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) a 11%, diluído em álcool cereal a 93,5%, foi obtido comercialmente no município de Canavieiras (15° 40' 30'' S e 38° 56' 50'' W), estado da Bahia, nordeste do Brasil.

2.2. Atividade antibacteriana do EHPV

Foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com Wiegand, Hilpert & Hancock (2008). A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do EHPV foram avaliadas frente a cultura *starter* comercial (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus*). As concentrações do EHPV avaliadas variaram de 55 a 0,001 mg mL⁻¹. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Foi considerada bactericida a concentração do extrato que não permitiu a reativação do microrganismo em meio isento do extrato.

2.3. Elaboração do salame de tilápia e condições de produção

Os ingredientes utilizados na elaboração do salame de tilápia estão listados na Tabela

1. Foram preparados 1 kg de massa para cada formulação de salame, perfazendo um total de 5 kg.

Tabela 1. Ingredientes utilizados em cada formulação do salame de tilápia.

Ingredientes (%)	F1	F2	F3	F4	F5
Filé de tilápia	85	85	85	85	85
Toucinho	15	15	15	15	15
Tempero pronto para salame	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
Cultura <i>starter</i> (mL/kg)	1	1	1	1	1
Glicose	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Amido	3	3	3	3	3
Coentro em pó	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Cebola em pó	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Alho em pó	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Páprica	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Corante	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Sal de cura	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Extrato de própolis vermelha	-	0,2	0,4	0,6	-
Antioxidante BHT	0,01	-	-	-	-

Os filés de tilápia foram moídos em moedor manual usando disco de 8 mm de diâmetro e o toucinho cortado em cubos (4°C). Em seguida, a carne e a gordura para cada formulação foram misturados e os demais ingredientes adicionados. A cultura *starter* foi padronizada em 10^8 UFC mL⁻¹ e adicionada a massa. A massa foi embutida em tripa artificial de colágeno

calibre 45 mm e o salame mantido em câmara para fermentação por 3 dias, umidade de 70-80% e temperatura de 25°C. Posteriormente, a temperatura da câmara foi reduzida para 14°C e mantida por 13 dias para maturar o salame, tempo necessário para perder cerca de 40% do peso inicial.

2.4. Análise sensorial

A avaliação das características sensoriais das formulações F1, F2, F3 e F4 foi realizada por 97 membros da comunidade acadêmica (no. parecer do comitê de ética 3.106.225). Foram aplicados os testes afetivos quantitativos de preferência (ordenação) e de aceitação para atributos específicos utilizando a escala hedônica de sete pontos (gostei muitíssimo a desgostei muitíssimo) e para impressão global utilizando as escalas hedônica, de atitude e de intenção de compra de sete pontos (gostei muitíssimo a desgostei muitíssimo).

2.5. Seleção das formulações após análise sensorial

As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas nos dias 0, 2, 4, 8 e 16 apenas com o controle positivo (F1, contendo BHT), o controle negativo (F5, sem EHPV e sem BHT) e a formulação F3 (0,4% de EHPV), com base nos resultados obtidos no teste de preferência da análise sensorial e na concentração que inibiu patógenos Gram-negativos em avaliação prévia (resultados não apresentados).

2.6. Análises microbiológicas

Foi realizado a estimativa da densidade de coliformes a 45°C por meio da técnica do número mais provável e a contagem de *Staphylococcus* spp. (Agar Baird-Parker), *Staphylococcus* coagulase positiva (Agar Baird-Parker), bactérias heterotróficas mesófilas (Plate Count Agar – PCA), bactérias ácido-láticas (Agar de Man, Rogosa e Sharpe – MRS)

e *Salmonella* spp. (Brilliant Green Agar, Deoxycholate-lysine-xylose agar – XLD, Agar MacConkey e Salmonella Shigella Agar) utilizando a metodologia proposta no Bacteriological Analytical Manual (BAM), descrita por Silva et al. (2010). Análises microbiológicas também foram realizadas nas amostras utilizadas na análise sensorial (2.4) de acordo com o padrão exigido pela legislação (Brasil, 2001), para garantir a segurança dos provadores.

2.7. Análises físico-químicas

2.7.1. Atividade de água (A_w) e análise de cor

A determinação da atividade de água (A_w) dos salames foi realizada com o auxílio de medidor da marca Novasina, modelo LabStart-aw. A cor foi avaliada utilizando o colorímetro da marca Konica Minolta, modelo CR-400 no sistema CIELAB, avaliando os parâmetros L^* (luminosidade), a^* (índice vermelho) e b^* (índice amarelo).

2.7.2. Determinação de umidade, lipídios, pH e perda de peso

As análises de umidade, lipídios e pH foram realizadas utilizando as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A perda de peso foi determinada como descrito por Cirolini et al. (2010).

2.7.3. Oxidação lipídica (TBARS) e bases voláteis totais (N-BVT)

A oxidação lipídica foi avaliada pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobárbiturico (TBARS), de acordo com a metodologia descrita por Tarladgis, Watts, Younathan & Dugan, (1960), com adaptações. As amostras de salame (10 g) foram homogeneizadas em 50 mL de solução aquosa de ácido tricloroacético (7,5%) por 2 min em liquidificador. Em seguida, a solução foi filtrada e o volume completado para 50 mL. A

solução foi destilada por 20 min para eliminar a interferência de corantes presentes nas amostras. Posteriormente, 5 mL foi misturado a 5 mL da solução aquosa de ácido tiobarbitúrico 0,02 M. A mistura foi aquecida em banho de água a 100 °C durante 45 minutos e depois resfriada em água com gelo. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. Para quantificar os níveis de TBARS nas amostras foi utilizado a equação $y = 2E+0,7x + 0,0744$, $R^2 = 0,9909$, obtida a partir da curva padrão de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP $1,0 \times 10^{-3}$ 141 M). Os resultados foram expressos em miligrama de malonaldeído por kg de salame ($\text{mg de MDA eq kg}^{-1}$).

A determinação das bases voláteis totais foi realizada conforme recomendação do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

2.8. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. As análises de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias Tukey foram realizadas usando o programa RStudio® (RStudio Team, 2015) para estudar diferenças significativas nos parâmetros avaliados. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para avaliar a ordem de preferência da análise sensorial foi utilizado a estatística não-paramétrica pelo método de Friedman. A análise gráfica foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism® 8.

3. Resultados e discussão

3.1. Atividade antibacteriana do EHPV

A CIM capaz de inibir a cultura *starter* foi de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e a CBM de 55 mg mL^{-1} . Embora baixas concentrações do EHPV possam inibir a cultura *starter*, essencial na fermentação de produtos cárneos, a concentração bactericida em que o microrganismo não

é capaz de ser reativado foi 1100 vezes superior a CIM. A inibição provavelmente é resultado da composição química rica em triterpenos e isoflavonas como observado em trabalho anterior utilizando extrato de própolis vermelha (Machado et al., 2016).

3.2. Análise sensorial

Todas as amostras de salame se encontravam dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira (Brasil, 2001). As notas médias obtidas nos testes afetivos da avaliação sensorial nas 4 formulações do salame são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Notas médias dos atributos sensoriais obtidos com as formulações de salame de tilápia.

Atributos	Formulações			
	F1	F2	F3	F4
IG (hedônica)	5,14±1,45 ab	5,26±1,09 a	4,90±1,25 ab	4,70±1,37 b
Sabor	5,19±1,38 a	5,12±1,19 ab	4,90±1,40 ab	4,70±1,37 b
Cor	5,40±1,00 a	5,42±0,90 a	5,22±0,93 ab	5,00±1,16 b
Aroma	5,15±1,09 a	5,01±1,19 ab	4,77±1,12 b	4,87±1,19 ab
Textura	5,06±1,00 ab	5,28±1,00 ab	5,35±1,02 a	5,02±1,20 b
Aspecto	5,06±1,19 a	5,26±1,07 a	4,96±1,15 a	5,03±1,14 a
IG (atitude)	4,92±1,95 a	4,85±1,62 a	4,34±1,72 ab	4,07±1,99 b
IG (int. de compra)	4,35±1,81 a	4,32±1,66 a	3,75±1,80 b	3,61±1,81 b

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p>0,05$) pelo Teste Tukey. IG: impressão global; F1: Formulação 1 (0,01% de BHT); F2: Formulação 2 (0,2% de própolis); F3: Formulação 3 (0,4% de própolis); F4: Formulação 4 (0,6% de própolis).

As formulações F1 (controle positivo) e F2 não foram significativamente diferentes ($p>0,05$) em nenhum dos atributos avaliados, indicando que a concentração de 0,2% de EHPV não compromete a aceitação dos provadores. A formulação F3 foi significativamente diferente ($p<0,05$) das formulações F1 e F2 apenas no aroma e intenção de compra. A maior concentração do EHPV na formulação F3 (0,4%) em relação as formulações F1 e F2, acentuou o aroma do salame contribuindo para menor intenção de compra. No entanto, apesar da menor aceitabilidade do aroma na formulação F3 ter sido decisivo na redução da intenção de compra, não afetou a aceitabilidade do sabor. O aroma da própolis é atribuído a compostos voláteis relacionados a especificidade da flora no local de coleta (Bankova, Popova & Trusheva, 2014).

A formulação F4 apresentou notas médias inferiores em relação as demais formulações, diferindo significativamente ($p<0,05$) em praticamente todos os atributos avaliados, com exceção do aspecto e aroma, devido a maior concentração do EHPV na formulação F4 (0,6%). Savoldi et al. (2019), avaliando diferentes tratamentos de salame de carne suína com substituição total do antioxidante sintético BHT por até 0,05% de própolis, não observaram diferença ($p>0,05$) no teste de aceitação para aparência global, aroma, textura e sabor.

A Figura 1 apresenta os resultados da impressão global (escala hedônica) das quatro formulações de salame, em porcentagem, dividido nas categorias rejeição, indiferença e aceitação. Independentemente da formulação, a aceitação do salame de tilápia com PV foi muito superior a rejeição e a indiferença, indicando que a adição do EHPV não afetou a aceitação dos consumidores e que o salame de tilápia com própolis apresenta potencial de comercialização.

As amostras mais preferidas foram as formulações F1, F2 e F3 (sem diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de ordenação, método de Friedman). Desse modo,

considerando que a formulação F1 e F5 são os controles e que a concentração do EHPV capaz de inibir patógenos Gram-negativos foi mais elevada (resultados não publicados), a formulação escolhida para as demais análises foi a F3 (0,4% de própolis).

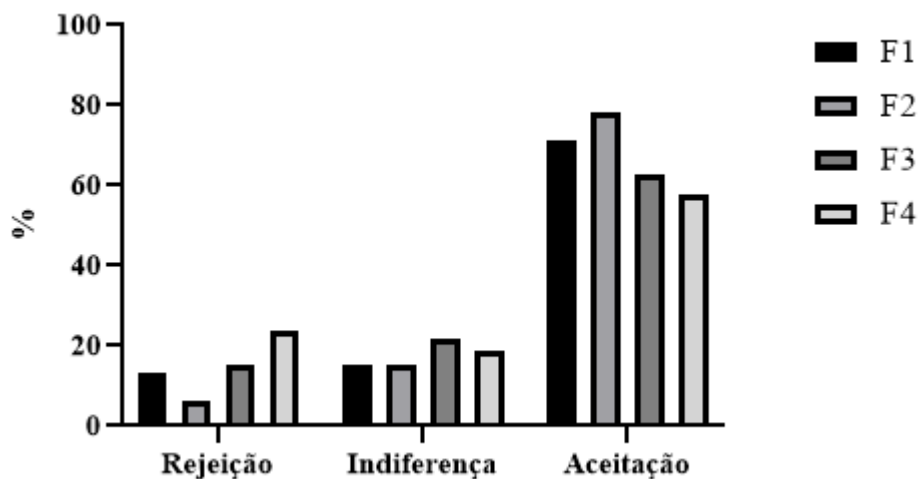


Figura 1. Porcentagem de notas inferiores a 4 (rejeição), iguais a 4 (indiferença) e superiores a 4 (aceitação) para impressão global (escala hedônica). F1: salame contendo BHT; F2: salame contendo 0,2% de EHPV; F3: salame contendo 0,4% de EHPV e F4: salame contendo 0,6% de EHPV.

3.3. Análise microbiológica do salame durante o período de fermentação

No início da fermentação (T0), a contagem de mesófilos e bactérias lácticas nas formulações F1 e F5 foi quase 2 ciclos logarítmicos superior ($p < 0,05$) a formulação F3 (Tabela 3), demonstrando que o EHPV inibiu as bactérias nesse primeiro momento. No segundo dia (T2) de fermentação, a contagem de bactérias lácticas na formulação F3 aumentou e passou a não diferir das demais formulações, revelando que apesar da inibição inicial, a viabilidade das bactérias não foi afetada e o crescimento foi reestabelecido,

sugerindo que a substituição de BHT por EHPV não afeta o processo fermentativo do salame de peixe.

Tabela 3. Análises microbiológicas (log UFC mL⁻¹) dos diferentes salames de peixe formulados durante o período de maturação.

Dias	Formulação	Mesófilos	Bactérias lácticas	<i>Staphylococcus</i> spp.	Coliformes a 45°C
T0	F1	8,20±0,06a	8,33±0,05a	8,12±0,06a	<1a
	F3	6,43±0,01b	6,50±0,03b	6,17±0,15b	<1a
	F5	8,23±0,07a	8,38±0,10a	8,17±0,09a	<1a
T2	F1	8,37±0,02a	8,93±0,25a	8,47±0,31a	2,96±0,13a
	F3	7,94±0,02b	8,56±0,67a	7,34±0,51b	2,76±0,22a
	F5	8,40±0,05a	8,95±0,27a	8,49±0,29a	2,96±0,00a
T4	F1	9,36±0,98a	8,08±0,24a	7,08±0,19a	<1a
	F3	9,08±0,89a	8,19±0,37a	6,46±0,04b	<1a
	F5	9,23±0,15a	8,55±0,14a	6,77±0,20ab	<1a
T8	F1	9,27±0,83a	8,62±0,06a	6,43±0,23a	<1a
	F3	7,71±0,19b	7,92±0,09b	6,13±0,24a	<1a
	F5	8,62±0,30ab	8,77±0,29a	6,52±0,23a	<1a
T16	F1	7,07±0,35ab	7,89±1,20a	6,05±0,57b	<1a
	F3	6,42±0,11b	7,22±0,74a	6,25±0,40b	<1a
	F5	8,73±0,22a	8,43±0,20a	7,39±0,37a	<1a

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma coluna, no mesmo dia, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

No oitavo dia (T8) houve uma redução significativa ($p < 0,05$) no crescimento de bactérias lácticas e mesófilos na formulação F3 em relação a F1, provavelmente decorrência do efeito inibitório do EHPV. Porém, após 16 dias de fabricação, as formulações F1 e F3 não diferiram entre si (Tabela 3), sugerindo que mesmo após a redução da atividade de água do embutido, as bactérias continuaram viáveis (Macedo, Pflanzler Júnior, Terra & Freitas, 2008).

Cirolini et al. (2010), avaliando a contagem de bactérias lácticas em salame tipo italiano com culturas *starter* nativas também verificaram valores de bactérias lácticas acima de 7 log UFC g⁻¹ após 21 dias de maturação. A elevada quantificação de bactérias lácticas é um requisito importante na produção de salame uma vez que atuam reduzindo o pH do produto com a produção de ácidos, inibindo patógenos e conferindo o sabor típico de salame (Tripathi & Giri, 2014).

Nos quatro primeiros dias se verificou um decréscimo significativo ($p < 0,05$) na contagem de *Staphylococcus* spp. na formulação F3 em relação a formulação F1, provavelmente pelo efeito inibitório do EHPV. No 16º dia de maturação, a contagem de *Staphylococcus* spp. apresentou redução nas formulações F1 e F3 quando comparada a formulação F5 (Tabela 3). De acordo com Stahnke (1995), a sobrevivência de *S. xylosus* é reduzida pela sensibilidade ao ácido produzido pelas bactérias lácticas. A presença de *Staphylococcus xylosus* e *S. carnosus* é importante pois são responsáveis pela estabilidade do produto (Drosinos et al., 2005).

A presença de coliformes foi observada apenas no segundo dia de fermentação em todas as formulações (Tabela 3), abaixo do limite preconizado pela legislação brasileira (3 log UFC g⁻¹), demonstrando boa qualidade higiênicossanitárias da matéria prima (Brasil, 2001). Esse resultado sugere que após 2 dias de fermentação, os coliformes foram fortemente inibidos pelo ácido produzido pelas bactérias lácticas, demonstrando a rápida ação inibidora

da cultura *starter* a microrganismos indesejáveis. Não foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva nem *Salmonella* spp. em nenhuma formulação em todo o processo de produção do salame.

3.4. Análises físico-químicas

3.4.1. pH

A redução do pH das formulações foi observada até o oitavo dia de maturação (Figura 2A). No entanto, se observou que nos dias T0 e T2 o pH da formulação F3 não apresentou alteração, diferindo ($p < 0,05$) das formulações F1 e F5. Isso deve ter ocorrido devido a inibição das bactérias lácticas pelo EHPV (Tabela 3), uma vez que as bactérias lácticas produzem ácido e são responsáveis pela redução do pH em embutidos fermentados. Esse resultado ainda sugere que, na formulação F3, apesar do crescimento de bactérias lácticas ter sido reestabelecido no tempo T2 (Tabela 3), a produção de ácido ficou atrasada até o tempo T8 ($p < 0,05$) (Figura 2A).

A redução do pH em embutidos cárneos fermentados é essencial para melhorar a segurança do produto, bem como para produzir características sensoriais desejáveis pois facilita a degradação de lipídios e proteínas precursoras do sabor pelas enzimas tissulares e microbianas (Savoldi et al., 2019).

A partir do oitavo dia o pH em todas as formulações aumentou não diferindo ($p > 0,05$) até o final da maturação. Esse comportamento pode ser explicado pela redução do metabolismo das bactérias lácticas em virtude da desidratação do salame e pela produção de amônia por meio da descarboxilação e desaminação dos aminoácidos, tornando o meio mais alcalino (Caccioppoli, Custódio, Vieira, Coelho & Glória, 2006). Savoldi et al. (2019) também observaram esse perfil comportamental no pH de salame tipo italiano adicionado de própolis.

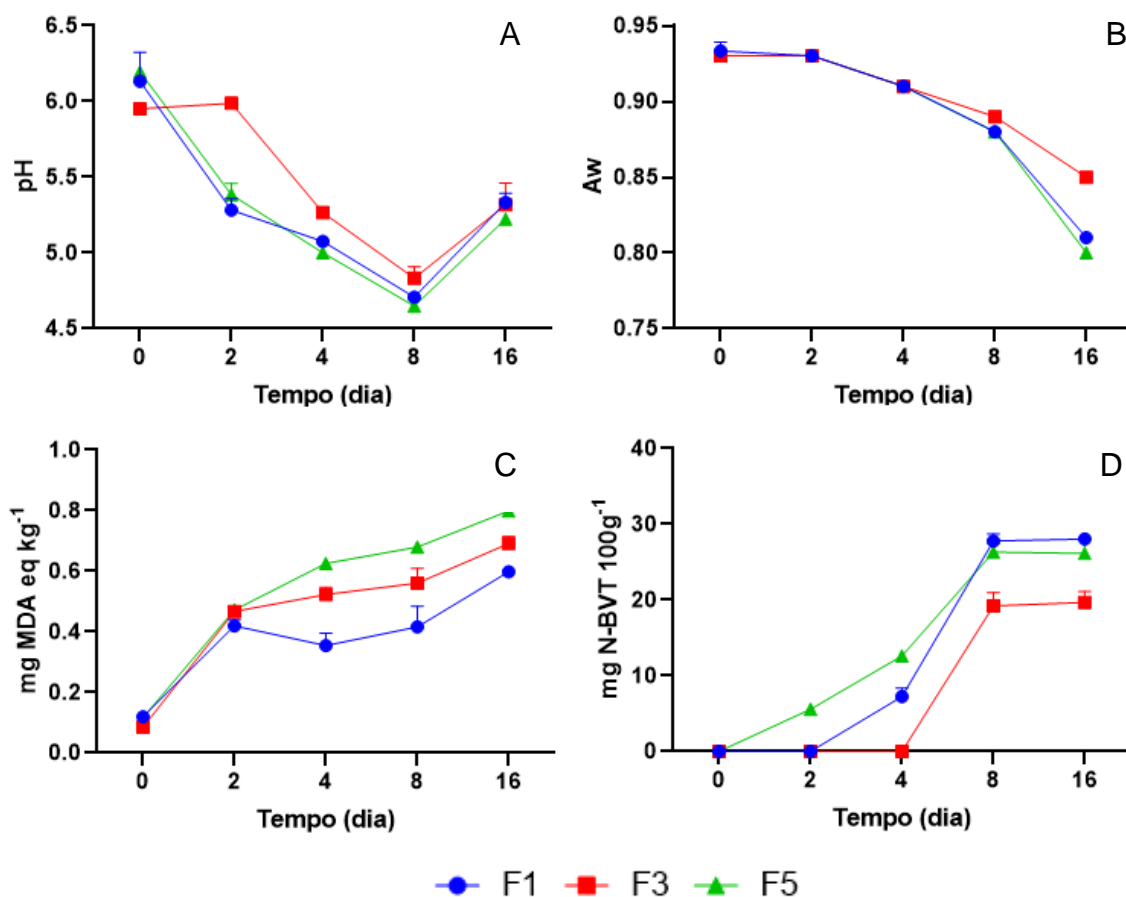


Figura 2. Valores médios de pH (A), atividade de água (A_w) (B), oxidação lipídica (C) e bases voláteis totais (D) nas três formulações de salame de tilápia durante o período de maturação. F1: salame contendo BHT; F3: salame contendo 0,4% de EHPV; e F5: salame sem BHT e EHPV.

3.4.2. Atividade de água

A A_w diminuiu em todas as formulações até o final da maturação dos salames (Figura 2B). Após 16 dias, a A_w das formulações F1 e F5 reduziu para 0,81 e 0,80 respectivamente e foi significativamente inferior ($p < 0,05$) a A_w da formulação F3 (0,85). No final da maturação, a A_w de todas as formulações avaliadas foi inferior ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira de 0,92 (Brasil, 2000). A redução observada na A_w

pode ser explicada pela diminuição do pH pois a capacidade de retenção de água das proteínas da carne é reduzida quando o pH se aproxima de seu ponto isoelétrico causando a desidratação no embutido (Mendes et al., 2014).

A redução da A_w em embutidos como o salame é fundamental para a conservação desses produtos uma vez que contribui para a segurança microbiológica do produto (Kunrath et al., 2017).

3.4.5. Oxidação lipídica

O valor de TBARS na formulação F1 variou de 0,11 a 0,60 mg de malonaldeído kg^{-1} enquanto na formulação F3 variou de 0,11 a 0,70 mg de malonaldeído kg^{-1} e na formulação F5 de 0,12 a 0,80 mg de malonaldeído kg^{-1} (Figura 2C). Todas as formulações apresentaram aumento no conteúdo de TBARS nos dois primeiros dias de fermentação, provavelmente devido a maior temperatura nesse período (25°C). Han & Park (2002) observaram que em salsichas de porco curadas e adicionadas de 0,4% de própolis, os valores de TBARS aumentaram a medida que a temperatura de armazenamento aumentava de 5° para 20°C.

Os valores de TBARS na formulação F3 (0,4% de EHPV) foram significativamente superiores ($p < 0,05$) aos encontrados na formulação F1 (controle-BHT) a partir do dia 4° dia, no entanto, quando comparado com a formulação F5 (controle negativo), os valores de TBARS da formulação F3 foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) (Figura 3C). Resultados semelhantes foram relatados por Kunrath et al. (2017), ao observarem que após 35 dias, no final da maturação do salame tipo italiano elaborado com carne suína e defumado a frio, a formulação contendo BHT foi mais eficiente ($p < 0,05$) na inibição da oxidação lipídica do que as formulações contendo 0,01 e 0,05% de própolis. Han & Park (2002), também verificaram que o extrato etanólico de própolis a 0,4% reduziu significativamente ($p < 0,01$) os valores de TBARS em salsichas curadas após 2 e 4 semanas de armazenamento.

A ação antioxidante de extratos de própolis é atribuída principalmente ao seu conteúdo fenólico (Andrade, Denadai, Oliveira, Nunes & Narain, 2017).

Apesar da maior oxidação lipídica na formulação F3 quando comparada ao controle contendo BHT, a adição de própolis inibe a oxidação lipídica quando comparada ao salame sem nenhum agente antioxidante (F5). Os valores obtidos nas três formulações de TBARS foram inferiores a 3 mg MDA kg⁻¹, valor considerado por Cadun, Cakli & Kisla (2005) como limite de percepção de ranço em pescado. De fato, como mostrou a análise sensorial, não foi observado diferença ($p > 0,05$) no sabor das formulações F1 e F3 (Tabela 2). A legislação brasileira não preconiza limite de malonaldeído em carne de peixe.

3.4.6. Bases voláteis totais

O conteúdo de N-BVT é utilizado como índice de qualidade do pescado para medir a extensão da degradação de proteínas, aminoácidos e a putrefação das carnes (Ali, Kassem & Atta, 2010). Os resultados de N-BVT encontrados nas formulações F1, F3 e F5 durante o período de maturação dos salames são apresentados na Figura 2D.

Os valores obtidos na formulação F1 variaram de 0 a 28,03 enquanto na formulação F3 variaram de 0 a 19,67 e na formulação F5 de 0 a 26,13 mg N-BVT 100g⁻¹. Diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações F1 e F3 começou a ser observada entre as formulações a partir do tempo T4 até o final da maturação (Figura 2D). Esse resultado pode ser atribuído a ação conservadora da própolis sobre bactérias proteolíticas (Ali et al., 2010). Também foi observado que após o 8º dia de maturação o conteúdo de N-BVT em todas as formulações se manteve praticamente estável até o final da maturação. O conteúdo de bases voláteis da formulação F5 foi significativamente superior ao encontrado nas formulações F1 e F3 após 2 e 4 dias de maturação. Apesar desse aumento inicial, após 8º dia, o conteúdo de

bases voláteis da formulação F5 também permaneceu estável até o final da maturação não diferindo ($p < 0,05$) da formulação F1.

Ali, Kassem & Atta (2010), verificaram que o conteúdo de N-BVT avaliado em salsicha oriental fresca adicionado de extrato etanólico de própolis a 0,6% variou gradualmente de 9,8 a 19,3. De acordo com Albuquerque & Zapata (2004) os valores de N-BVT variam a depender da metodologia utilizada, a espécie do pescado e o estágio de alteração. Todos os valores encontrados foram inferiores ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira de 30 mg N-BVT 100g^{-1} (Brasil, 1997).

3.4.4. Umidade, lipídios e perda de peso

Ao final do processo de maturação, a umidade da formulação F1 foi de 18,6% enquanto que da formulação F3 foi de 21,8% e da F5 de 19,4%, dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira de no máximo 40% de umidade (Brasil, 2000). Kunrath et al. (2017) encontraram teores de umidade superiores ao presente trabalho de 30% e 29% em salame tipo italiano adicionado de 0,01% e 0,05% de própolis respectivamente, após a maturação. Teores baixos de umidade baixos funcionam como barreira para a proliferação de microrganismos deteriorantes. Além disso, em combinação com o pH ácido, baixos teores de umidade conferem ao salame textura e sabor característicos (Kunrath et al., 2017).

O lipídio é considerado um constituinte importante do salame pois confere suculência, sabor e aroma. O teor de lipídios foi de 7,01% na formulação F1 (controle), de 12,61% na formulação F3 e 8,2% na formulação F5 em conformidade com a legislação brasileira que estabelece um valor máximo de 35% (Brasil, 2000). No presente estudo, a quantidade de lipídio encontrada pode ser atribuída principalmente a baixa quantidade de gordura utilizada na produção dos salames, uma vez que a tilápia é considerado um peixe magro.

A média da perda de peso da formulação F1 foi de 39,63%, da F3 foi de 40,77% e da F5 de 38,9%. Esses resultados encontram-se na faixa considerada ideal para produtos fermentados secos entre 30 e 40% (Cirolini et al., 2010). Valores superiores foram encontrados por Cirolini et al. (2010) após a maturação de salame tipo italiano com diferentes culturas *starters*.

3.4.3. Determinação da cor

O valor de L* (luminosidade) foi significativamente maior para a formulação F1 e F5 no tempo T2. No entanto, após 16 dias de maturação, o valor de L* diminuiu para todas as formulações e foi maior para a formulação F3 ($p < 0,05$) (Tabela 4). De acordo com Bozkurt & Bayram (2006), o decréscimo no valor de L* indica formação de cor escura em decorrência de reações de escurecimento. Já Bernardi, Favaro-Trindade, Trindade, Balieiro & Contreras-Castillo (2013), relataram que a redução da luminosidade é resultado da menor quantidade de luz refletida que ocorre em virtude da perda de umidade e concentração dos componentes. Savoldi et al. (2019) também verificaram decréscimo dos valores de L* após 28 dias de maturação em salame tipo italiano adicionado de própolis.

Os valores de a* (índice vermelho) não variaram significativamente ($p > 0,05$) entre as formulações durante 8 dias de maturação, porém, após 16 dias, o valor de a* da formulação F3 foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao das formulações F1 e F5 (Tabela 4). Os valores de a* aumentaram no final da produção dos salames devido ao processo de cura, onde a mioglobina, principal pigmento cárneo, ao reagir com o óxido nítrico forma o composto nitrosomioglobina, que confere a coloração avermelhada aos produtos curados (Savoldi et al., 2019), embora no caso da formulação F3 a maior intensidade da cor vermelha também tenha sido resultado da presença do EHPV. Cirolini et al. (2010), ao avaliarem

amostras de salame sem adição de própolis, também verificaram valores de a^* mais baixos (a^* 12,32 - 13,97).

Tabela 4. Valores médios da determinação de cor nos salames formulados F1: salame contendo BHT; F3: salame contendo 0,4% de EHPV; e F5: salame sem BHT e EHPV, por meio dos parâmetros L^* (luminosidade), a^* (índice vermelho) e b^* (índice amarelo).

Dias	Formulação	Índices de cor		
		L^*	a^*	b^*
0	F1	43,79±0,40a	10,02±0,14a	23,41±0,88a
	F3	42,66±0,65a	10,29±0,43a	22,31±0,85a
	F5	45,46±0,82a	9,8±0,10a	24,44±0,28a
2	F1	48,04±1,30a	9,61±0,73a	21,42±0,88a
	F3	44,66±0,64b	9,00±0,40a	19,63±0,74a
	F5	48,08±1,47a	9,93±0,43a	20,01±0,71a
4	F1	47,25±0,62a	10,17±1,17a	18,94±0,54a
	F3	44,75±1,36a	8,70±1,13a	17,63±1,75a
	F5	48,61±1,22a	9,69±0,47a	20,41±0,63a
8	F1	47,77±2,80a	7,90±2,83a	18,62±1,19a
	F3	47,76±0,68a	8,66±0,77a	18,28±1,49a
	F5	48,09±1,61a	10,18±0,57a	19,77±0,38a
16	F1	40,70±4,66b	14,26±0,92b	28,95±2,08b
	F3	45,36±0,09a	17,65±0,11a	36,08±0,40a
	F5	39,70±1,67b	15,70±0,26b	29,31±1,39b

Médias acompanhadas pela mesma letra, na mesma coluna, no mesmo dia, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Após 16 dias, os valores de b^* (índice amarelo) também aumentaram, especialmente para a formulação F3 ($p < 0,05$). De acordo com American Meat Science Association (1991), os aumentos no valor de b^* estão relacionadas com o desbotamento da cor das carnes. De acordo com Zakaria & Sarbon (2018), os valores de b^* de embutidos curados de emulsão de peixe aumentam durante a maturação.

Nos três índices de cor avaliados, observou-se que a formulação F5 apresentou a mesma tendência de variação encontrada na formulação F1, indicando que o BHT não influencia a coloração do salame de tilápia. De fato, a formulação F5 não diferiu significativamente da F1 durante todo o período de maturação.

4. Conclusão

O uso de EHPV no salame de tilápia mostrou eficácia no controle do processo oxidativo podendo ser usado em substituição ao antioxidante sintético BHT. Além disso, o salame de tilápia contendo própolis apresentou características microbiológicas e físico-químicas desejáveis sendo bem aceito sensorialmente. Estudos futuros são necessários para avaliar a influência de extratos de própolis na vida útil do produto após o processo de maturação.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Referências

- Albuquerque, W. F., & Zapata, J. F. F. (2004). Estado de frescor, textura e composição muscular da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) abatida com dióxido de carbono e armazenada em gelo. *Revista Ciência Agronômica*, *35*, 264-271.
- Ali, F. H., Kassem, G. M., & Atta, O. A. (2010). Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria Italiana*, *46*, 167-172.
- American Meat Science Association (AMSA) (1991). *Guidelines for meat color evaluation*. Reciprocal Meat Conference Proceedings: 44, (pp. 1–17).
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., Oliveira, C. S., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, *101*, 129–138.
- Arihara, K., & Itoh, M. (2000). UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *56*, 227–230.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: Chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, *8*, 1-28.
- Bernardi, S., Favaro-Trindade, C. S., Trindade, M. A., Balieiro, J. C. C., & Contreras-Castillo, C. J. (2013). Italian-type salami with propolis as antioxidant. *Italian Journal of Food Science*, *25*, 1-8.

Bozkurt, H., & Bayram, M. (2006). Colour and textural attributes of sucuk during ripening. *Meat Science*, 73, 344–350.

Brasil. Instrução Normativa n. 22 de 31 de julho de 2000. *Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de salame*. Publicado no Diário Oficial da União de 03 ago. 2000.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 185, de 13 de maio de 1997. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 Maio 1997.

Brasil (2001). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no. 12. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos de. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Poder executivo. Brasília, pp.1-48, 2 de janeiro de 2001.

BrCAST - *Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos*
Versão 6.0 (Janeiro de 2017)

Caccioppoli, J., Custódio, F. B., Vieira, S. M., Coelho, J. V., & Glória, M. B. A. (2006). Aminas bioativas e características físico-químicas de salames tipo italiano. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 58, 648–657.

Cadun, A., Cakli, S., & Kislal, D. (2005). A study of marination of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*, Lucas, 1846) and its shelf life. *Food Chemistry*, 90, 53–59.

- Cirolini, A., Fries, L. L. M., Terra, N. N., Milani, L. I. G., Urnau, D., Santos, B. A. dos, ... Rezer, A. P. de S. (2010). Salame tipo italiano elaborado com culturas starters nativas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 171–179.
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., & Metaxopoulos, J. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 69, 307–317.
- Fernandes, R. P. P., Trindade, M. A., Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., & Melo, M. P. De. (2016). Effects of oregano extract on oxidative, microbiological and sensory stability of sheep burgers packed in modified atmosphere. *Food Control*, 63, 65–75.
- Frozza, C. O. S., Garcia, C. S. C., Gambato, G., Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., ... Roesch-Ely, M. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 137–142.
- Han, S., & Park, H. (2002). Accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances in cured pork sausages treated with propolis extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1487–1489.
- Hernández, F., Portolés, T., Pitarch, E., & López, F. J. (2009). Searching for anthropogenic contaminants in human breast adipose tissues using gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 44, 1–11.
- IAL. (2008). Instituto Adolf Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*.

<http://www.ial.sp.gov.br>, Accessed date: 17 September 2019.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003* – POF. Rio de Janeiro, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Pesquisas de orçamentos familiares 2008-2009*. Aquisição alimentar domiciliar *per capita* Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro, 2010.

Kubow, S. (1992). Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radical Biology and Medicine*, *12*, 63–81.

Kunrath, C. A., Savoldi, D. C., Mileski, J. P. F., Novello, C. R., Alfaro, A. da T., Marchi, J. F., ... Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brazil. (2017). Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. *Brazilian Journal of Food Technology*, *20*, 154-161.

Macedo, R. E. F., Pflanzler Júnior, S. B., Terra, N. N., & Freitas, R. J. S. de. (2008). Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: Características de qualidade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *28*, 509–519.

Machado, C. S., Mokochinski, J. B., Lira, T. O., Oliveira, F. C. E., Cardoso, M. V., Ferreira, R. G., Sawaya, A. C. H. F., Ferreira, A. G., Pessoa, C., Cuesta-Rubio, O., Monteiro, M. C., Campos, M. S., & Torres, Y. R. (2016). Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *26*, 1–11.

Mendes, A. C. G., Rettore, D. M., Ramos, A. L. S., Cunha, S. F. V., Oliveira, L. C., & Ramos, E. M. (2014). Salames tipo Milano elaborados com fibras de subprodutos da produção de vinho tinto. *Ciência Rural*, *44*, 1291–1296.

Ribeiro, J. S., Santos, M. J. M. C., Silva, L. K. R., Pereira, L. C. L., Santos, I. A., Silva Lannes, S. C., & Silva, M. V. (2019). Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat Science*, *148*, 181–188.

RStudio team. *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio Inc., Boston, MA. <http://www.rstudio.com>, 2015.

Savoldi, D. C., Kunrath, C. A., Oliveira, D. F., Novello, C. R., Coelho, A. R., Marchi, J. F., & Tonial, I. B. (2019). Características físicas e sensoriais de Salame Tipo Italiano com adição de própolis. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, *18*, 212–221.

Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S. & Gomes, R. A. R. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água*. Rio de Janeiro: Varela, 2010.

Sousa, A. B. B., Almeida, N. M. (2018). Ácidos graxos em peixes marinhos e de água doce: um comparativo. *Revista de Ciência, Tecnologia e Humanidades do IFPE*, *10*, 105-120.

Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels—Part I. Chemical and bacteriological data. *Meat Science*, *41*, 179–191.

Tarladgis, B. G., Watts, B. M., Younathan, M. T., & Dugan, L. (1960). A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *37*(1), 44–48. <https://doi.org/10.1007/BF02630824>

Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, *9*, 225–241.

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, *3*, 163–175.

Yang, W., Wu, Z., Huang, Z. Y., & Miao, X. (2017). Preservation of orange juice using propolis. *Journal of Food Science and Technology*, *54*, 3375–3383.

Zakaria, N. A., & Sarbon, N. M. (2018). Physicochemical properties and oxidative stability of fish emulsion sausage as influenced by snakehead (*Channa striata*) protein hydrolysate. *LWT – Food Science and Technology*, *94*, 13–19.