**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Micro-organismos bioprotetores em salames com baixo teor de sal
e seus efeitos sobre a qualidade global e sensorial**

Marcio Aurélio de Almeida

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2015**

Marcio Aurélio de Almeida
Medico Veterinário

**Micro-organismos bioprotetores em salames com baixo teor de sal e seus
efeitos sobre a qualidade global e sensorial**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **CARMEN JOSEFINA CONTRERAS CASTILLO**

Co-Orientador:
Profa. Dra. **NILDA DORIS MONTES VILLANUEVA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Almeida, Marcio Aurélio de

Micro-organismos bioprotetores em salames com baixo teor de sal e seus efeitos sobre a qualidade global e sensorial / Marcio Aurélio de Almeida. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

120 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Redução de sal 2. Salame tipo Italiano 3. Beaker sausage 4. Cloreto de potássio
5. Cloreto de cálcio I. Título

CDD 664.92
A367m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedicatória

Ao Grande Arquiteto do Universo

Ao meu filho Otávio e minha esposa Keila

Aos meus Pais,

Aurélio (in memoriam) e Rosa Maria, meus eternos mentores

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização dessa tese de doutorado: meus familiares, orientadores, companheiros de trabalho e amigos.

Essa tese de doutorado e o resultado de meu esforço não só acadêmico, mas também pessoal que só foi possível de ser realizado em um ambiente bem estruturado e acolhedor. Assim agradeço a companhia de vocês neste período tão importante de minha vida. Meu eterno obrigado

"The only thing we have to fear is fear itself"

Franklin D. Roosevelt

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.3 Objetivos	22
1.3.1 Objetivos específicos.....	23
Referências	23
2 PERFIL SENSORIAL E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SALAMES TIPO ITALIANO ELABORADOS COM BAIXO TEOR DE SÓDIO... ..	29
Resumo	29
Abstract	29
2.1 Introdução	30
2.2 Material e Métodos.....	31
2.3 Resultados e discussão.....	35
2.4 Conclusão	43
Referências	44
3 ESTUDO DA REDUÇÃO DE NaCl EM SALAME E SUBSTITUIÇÃO COM MISTURAS DE KCl + CaCl ₂ POR ANÁLISE SENSORIAL E SPME- HRGC/MS DOS VOLÁTEIS	47
Resumo	47
Abstract	47
3.1 Introdução	48
3.2 Material e Métodos.....	50
3.3 Resultados e Discussão.....	54
3.4 Conclusão	59
Referências	59
4 DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS CÁRNEAS PELA AÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS AUTÓCTONES COM DESENVOLVIMENTO DE SABOR SALAMES TIPO ITALIANO COM BAIXO TEOR DE SÓDIO.....	67
Resumo	67
Abstract	67
4.1 Introdução	68

4.2 Material e Métodos.....	69
4.3 Resultados e Discussão.....	74
4.5 Conclusão	88
Referências	89
5 IMPACTOS DAS ALEGAÇÕES DE SAÚDE EM PRODUTOS FERMENTADOS COM BAIXO TEOR DE SÓDIO.....	95
Resumo.....	95
Abstract.....	95
5.1 Introdução	96
5.2 Material e Métodos.....	98
5.2.2 Determinação de Sódio.....	98
5.3 Resultados e Discussão.....	103
5.4 Conclusão	115
Referências	115
6 CONCLUSÃO GERAL	119

RESUMO

Micro-organismos bioprotetores em salames com baixo teor de sal e seus efeitos sobre a qualidade global e sensorial

As mudanças dos hábitos de consumo do consumidor, força o desenvolvimento de produtos industrializados mais saudáveis. Assim, pesquisadores em ciência e tecnologia de produtos cárneos, têm focado parte de suas pesquisas no desenvolvimento de produtos com níveis reduzidos de sódio. O presente estudo teve como objetivo buscar por micro-organismos bioprotetores e proteolíticos para o uso em salames com baixo teor de cloreto de sódio (NaCl). O primeiro capítulo consiste em uma revisão de literatura, sendo o segundo o desenvolver salames italianos com 1,0% NaCl com a adição ou não de cloreto de potássio (KCl) e cloreto de cálcio (CaCl_2) com características sensoriais semelhantes aos descritos no salames comerciais com 2,5% de NaCl adicionado. Os resultados mostraram diferenças de pH e Aw, devido à redução de NaCl. As misturas substitutas de sal (KCl/ CaCl_2) nos salames não afetaram tecnologicamente a elaboração de salames. Para os consumidores, esta substituição não acarretou diferenças significativas ($p > 0,05$) na aparência (cor), porém observou-se diferenças nos demais atributos. Com relação ao teor de sal, os consumidores consideraram os tratamentos com baixo teor de NaCl adicionados dos substitutos KCl e CaCl_2 como ideais. No terceiro capítulo, o objetivo foi analisar os aldeídos produzidos pela lipólise e proteólise assim como a aceitação sensorial de salames tipo Italiano com reduzido conteúdo de sódio. Das seis amostras elaboradas, todas foram monitoradas quanto ao pH e atividade de água e após a maturação do salame, foi realizada análise do perfil de voláteis e comparado com a sensorial. Os resultados mostraram a existência de uma relação entre a concentração de aldeídos e aceitação sensorial. Com a finalidade de elucidar a proteólise dos micro-organismos escolhidos, foi realizado no quarto capítulo um estudo com modelos Beaker Sausage (BS) para simular a produção de salame com baixo conteúdo de sódio para avaliar a produção de aminoácidos e peptídeos de culturas starters bacteriocinogênicas. O BS contendo *Enterococcus mundtii* CRL35 apresentou a maior variedade de peptídeos pequenos, seguido pela BS contendo *L. curvatus* CRL1862. Embora o modelo de carne inoculadas com *Lactobacillus plantarum* CRL681 produziu o maior número de peptídeos derivados de proteínas sarcoplasmáticas. A pequena quantidade considerável de péptido produzido no BS inoculado permitiu inferir que os conteúdos mais baixos de sódio não afetam negativamente a ação das peptidases microbianas. O objetivo do último capítulo, foi avaliar o efeito das alegações de saúde sobre as aceitação dos salames tipo Italiano com reduzido conteúdo de sódio. Neste estudo, foi avaliada a expectativa gerada pelas alegações de saúde e os resultados mostraram que as alegações tiveram pouco efeito na aceitação dos consumidores decorrentes em valores de aceitação baixo para o protótipo de laboratório. Assim, pode-se concluir que a produção de salames tipo Italiano com teores reduzidos de NaCl, adicionados de CaCl_2 + KCl é viável com a pouca adição destes substitutos e o uso de culturas starters bacteriocinogênicas, que também são altamente proteolíticas de ser melhor estudado a fim de adequar a proteólise ideal para a formação dos compostos desejáveis no salame com baixo teor de sódio.

Palavras-chave: Redução de sal; Salame tipo Italiano; Beaker sausage; Cloreto de potássio; Cloreto de cálcio

ABSTRACT

Bacteriocin-producing microorganisms in low-sodium salami and their effects on global and sensory quality

Changes in consumers' eating habits and lifestyle have required the development of healthier processed products. Thus, researchers in science and meat products technology have focused their studies on the development of products with reduced sodium contents. This study investigated the use of bioprotectants and proteolytic microorganisms for low-sodium NaCl in salami. The chapter 1 consists in a literature review. In the second chapter, the objective was to develop Italian salami with 1.0% NaCl with or without the addition of potassium chloride (KCl) and calcium chloride (CaCl_2) with sensory characteristics similar to those described in the commercial salami with 2.5% NaCl added. The results showed differences in pH and water activity (A_w) due to the reduction of NaCl. Salt substitutes chloride (KCl / CaCl_2) in salamis did not technologically affect salami preparation. For consumers, this replacement did not cause significant differences ($p > 0.05$) in appearance (color), but there were differences in other attributes. Regarding the salt content, consumers considered treatment with low NaCl content and added with KCl and CaCl_2 as ideal substitutes. In the third chapter, the goal was to analyze the aldehydes produced by lipolysis and proteolysis as well as sensory acceptance of the Italian salami type with reduced sodium content. All six samples prepared were monitored for pH and A_w and after salami maturation, the volatile profile analysis was performed and compared with the sensory analysis. The results show the existence of a relationship between the concentration of aldehydes and sensory acceptance. In order to elucidate proteolysis of selected microorganisms, in the fourth chapter a study of models Beaker Sausage (BS) was conducted to simulate production of low-sodium salami to evaluate the production of amino acids and peptides of bacteriocinogenic starter cultures. The BS containing *Enterococcus mundtii* CRL35 showed the greatest variety of small peptides, followed by BS containing *Lactobacillus curvatus* CRL1862. However, the meat model inoculated with *Lactobacillus plantarum* CRL681 produced the largest number of sarcoplasmic proteins derived from peptides. A considerable number of peptides produced in the BS inoculated allowed to infer that lower sodium content did not affect the action of microbial peptidases. The purpose of the last chapter was to evaluate the effect of health claims on the acceptance of Italian-type salami with reduced sodium content. In this study, the expectation generated by health claims were analyzed and the results showed that health claims had little effect on the increase of consumer acceptance for the prototype developed in the laboratory. Thus, it can be concluded that the production of Italian-type salami with reduced levels of NaCl, KCl + CaCl_2 added is feasible but low addition of these substitutes must be considered. Moreover, the use of bacteriocinogenic starter cultures, highly proteolytic to achieve optimal proteolysis in the formation of the desired compounds, should be adjusted to low-sodium salami.

Keywords: Salt reduction; Italian salami; Beaker sausage; Potassium chloride;
Calcium chloride

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Produção e consumo de salame

A produção de alimentos enfrenta diferentes desafios que vão desde satisfazer as necessidades nutricionais básicas das pessoas até cumprir as complexas exigências relacionadas à segurança alimentar e características sensoriais. Atualmente pesquisadores em ciência e tecnologia de produtos cárneos, tem focado parte de suas pesquisas no desenvolvimento de produtos com níveis reduzidos de sódio e com boas características sensoriais, que possam ser armazenados por um maior período sem o aumento da adição de aditivos químicos.

Dentre as carnes consumidas mundialmente, destaca-se a carne suína, com um total de 101.127 milhões de toneladas em 2014 (FNP, 2014). A carne suína possui sabor e maciez característicos, além de ser fonte de vitaminas e minerais (SARCINELLI; VENTURINI; SILVA, 2007). A maior parte da carne suína produzida no Brasil é utilizada na fabricação de produtos processados e um dos mais consumidos é o salame.

Os produtos fermentados, como por exemplo o salame possui um alto valor agregado chegando a custar seis vezes mais que a carne *in natura* e são produtos bem aceitos pelos consumidores, porém os produtos cárneos fermentados constituem uma importante fonte de sódio, pois durante sua elaboração, adiciona-se entre 1,5 e 3,0% de NaCl. Embutida a massa, leva-se à câmara de maturação, onde permanece durante 30 a 40 dias, ocorrendo nesse período desidratação e aumento da concentração do NaCl, que atinge valores entre 2,5 e 5,0% (CICHOSKI et al., 2009). Deve-se observar que a ingestão de sódio recomendada na dieta diária é de 1,5 g, o que corresponde a 3,75 g de cloreto de sódio (TOLDRÁ, 2007; COZZOLINO, 2005). Do ponto de vista de saúde para alguns grupos de indivíduos que precisam de baixo nível de sódio em sua dieta, a indústria de carnes está focada na redução destes níveis em alimentos processados.

No Brasil, a produção e o consumo de embutidos fermentados

encontram-se fortemente ligados à tradição dos imigrantes italianos, espanhóis e portugueses e este fato incorporou características mediterrâneas na tecnologia de produção (menor acidez). Nos últimos anos as indústrias passaram a incorporar culturas iniciadoras (culturas *starters*) para conseguir uma produção mais homogênea, diminuindo o aparecimento de salames com “off flavor”, coloração indesejável e desta forma refletindo em uma maior rentabilidade, porém isso resultou na produção de embutidos crus fermentados com uma qualidade sensorial significativamente menor quando comparados com embutidos fermentados europeus (FADDA et al., 2010).

1.1.2 Salame e a formação de suas características sensoriais

É considerado um embutido cárneo, produzido com uma mistura de carnes tanto suínas quanto bovinas com agentes de cura em tripas naturais ou artificiais e submetidos a um processo de fermentação, iniciado por microrganismos que são essenciais para o processo. A maioria dos salames é submetida ao processo de secagem e podem ou não ser armazenados sob refrigeração (LÜCKE, 1994). No Brasil, são definidas características de identidade e qualidade para oito tipos de salame (BRASIL, 2000), sendo que a diferenciação entre eles está no tipo de matéria-prima utilizada, granulometria da carne e do toucinho e na condimentação.

Os produtos fermentados estão inseridos no grupo dos alimentos mais seguros para os consumidores, pois sua produção envolve uma combinação de condições, como baixo pH, atividade de água, presença de microbiota competitiva e sais de cura, que dificultam a proliferação de microrganismos patógenos (GOUNADAKI et al., 2007).

Uma característica marcante na sua produção é a fermentação, considerada uma das mais antigas tecnologias utilizadas para conservar o produto por mais tempo, além de auxiliar na transformação de seus compostos, alterando positivamente suas características sensoriais. A qualidade do salame é determinada pela formação de produtos finais, originados da quebra de proteínas, lipídios e carboidratos pela ação de enzimas musculares endógenas e bacterianas. O conhecimento da ação destas enzimas permite a escolha da carne e da cultura "*starter*" para melhorar o sabor e segurança dos produtos cárneos fermentados (MOLLY et

al., 1997). Dentre as diversas características sensoriais do salame, a cor, o sabor e a textura constituem fatores decisivos no momento da compra por parte dos consumidores (TERRA, 2003). A cor é produzida pela interação entre os pigmentos da carne (mioglobina) e dos produtos resultantes da redução dos nitratos e nitritos adicionados resultando no composto nitrosomioglobina, um pigmento vermelho característico de produtos curados crus (ORDÓÑEZ et al., 1999).

O sabor típico de embutidos fermentados é resultado do equilíbrio entre compostos voláteis (álcool, cetonas, aldeídos e furanos) e não-voláteis (aminoácidos, peptídeos, açúcares e nucleotídeos), provenientes das matérias-primas utilizadas (carnes, especiarias, nitritos e outros aditivos) ou gerados a partir de reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação e maturação (FLORES et al., 1997; TOLDRÁ, 1998; STAHNKE, 2002). Os componentes não voláteis, como peptídeos e aminoácidos, fornecem gostos básicos, como doce, salgado, azedo e amargo. Estes compostos são produzidos durante a hidrólise das proteínas da carne, sendo que sua presença determina, na maioria das vezes, as características sensoriais do produto final.

1.1.3 Cloreto de potássio e cloreto de cálcio como substitutos para o cloreto de sódio

Atualmente devido a pressões de órgãos governamentais e consumidores, a indústria de produtos cárneos está dando importância à quantidade de sódio adicionada em seus produtos. No caso dos salames, existem dificuldades a serem enfrentadas, pois o cloreto de sódio favorece a estabilidade microbiológica dos produtos fermentados.

Ruusunen e Puolanne (2005) estudaram os efeitos do cloreto de sódio com relação à capacidade de ligação da água da carne. Quando começa o período de secagem, a ligação da água é elevada, mas começa a diminuir com a diminuição do pH e aumento da força iônica, esta fase inicial favorece a coesão das partículas e mais tarde a diminuição da ligação favorece a evaporação da água, favorecendo a secagem, resultando em um produto com baixa atividade de água. Uma das alternativas mais viáveis para a substituição parcial do NaCl são KCl, MgCl₂ e CaCl₂, porém estes

substitutos apresentam restrições, uma vez que podem influenciar na qualidade sensorial dos produtos, dependendo da quantidade utilizada (IBAÑEZ et al., 1996). As combinações entre NaCl e KCl em misturas são de uso comum, porém normalmente não ultrapassam a proporção de 50:50 em função principalmente das alterações sensoriais que produzem (PHELPS, 2006). Todavia, quando a substituição atinge níveis de 50%, ocorre o aparecimento de sabor amargo e aroma metálico no produto e, nos produtos cárneos fermentados, pode promover alterações na etapa de fermentação, podendo ocorrer desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (PEARSON, 1999).

1.1.4 Bioproteção

A tendência na indústria da carne é focalizar em produtos com altos padrões sensoriais, longa vida útil e que contenham nutrientes específicos para cobrir as necessidades nutricionais dos consumidores. Em paralelo, os consumidores são cada vez mais exigentes para consumir alimentos livres de patógenos, com um mínimo de conservantes e aditivos (FADDA et al, 2010). Essa exigência por produtos com o mínimo de conservantes e aditivos direcionou as pesquisas para a busca de técnicas de preservação mais naturais.

Neste sentido, as bactérias lácticas empregadas na fermentação de alimentos são capazes de inibir ou reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, por meio da produção de vários agentes antimicrobianos. A acidificação é, provavelmente, o fator primário na preservação de produtos de fermentação láctica. Entretanto, outros compostos como diacetil, dióxido de carbono, peróxido, etanol e bacteriocinas podem exercer ação inibitória sobre diferentes grupos de microrganismos (HELANDER et al., 1997).

A preservação de alimentos usando o controle natural de sua microbiota ou de seus metabolitos antimicrobianos tem sido chamada bioproteção ou biopreservação (STILES, 1996). Uma alternativa é o uso de microbiota protetora e/ou seus peptídeos antimicrobianos, as bacteriocinas. As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizados no ribossomo e liberados no meio extracelular que apresentam ação bactericida ou

bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas, dentre elas, importantes patógenos de veiculação alimentar como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereuse* *Staphylococcus aureus* (HERNÁNDEZ et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2008). Dentre as bactérias lácticas de interesse para produtos cárneos fermentados pode-se citar o *Lactobacillus curvatus* CRL 705.

Foi verificado que essa bactéria láctica isolada de embutidos cárneos fermentados da Argentina produz Lactocin 705 e possui uma atividade contra os seguintes microorganismos: outras bactéria lácticas, *B. cereus*, *B. thermosphacta* e *Propionibacterium*. Além disso produz outra bacteriocina, a Lactocina AL 705, que tem como principal característica ser muito eficiente na inibição da *Listeria monocytogenes*. (CASTELLANO et al., 2008), porém esta ainda não foi completamente isolada e sequenciada. Tem sido demonstrado *in vitro* que as bactérias lácticas (LAB), em particular *L. sakei* e *L. curvatus* são capazes de hidrolisar as proteínas sarcoplasmáticas e em menor escala as miofibrilas, gerando pequenos peptídeos e aminoácidos que atuam diretamente na formação do aroma e sabor ou como precursores de outros compostos que contribuem para o perfil sensorial do produto final (DÍAZ et al., 1997; RODRIGUEZ et al., 1998; FADDA et al., 1998).

As LAB pela sua atividade nitrato-redutase favorecem o desenvolvimento da cor e além disso possuem outras atividades como produtoras de aroma e sabor. As LAB e os cocos catalase positiva/coagulase negativa (CGC), que fazem parte deste grupo intervêm direta ou indiretamente nos fenômenos que ocorrem durante a maturação, influenciando diretamente nas características sensoriais do produto final (TALON et al., 2002).

1.1.4 Oxidação protéica e lipídica

A fermentação do salame promovida pelas bactérias lácticas adicionadas a massa (diminuição do pH), associada à temperatura da câmara de fermentação (25 °C a 18 °C) desencadeia o início da proteólise das proteínas promovidas pelas enzimas endógenas da carne, pois o pH da carne (pH 4,5 a 5,5) entra na faixa ideal para a ação destas enzimas, com a liberação de maiores quantidades de tirosina, prolina, histidina, metionina,

triptofano e lisina (CICHOSKI, 2011), porém esses compostos são mais susceptíveis a oxidação (XIONG, 2000). Os grupos amino e fenólicos são mais suscetíveis à oxidação devido à sua estrutura. Os aminoácidos triptofano, histidina, prolina, lisina, cisteína, metionina e tirosina também são propensos à oxidação (STADTMAN, 2004).

Durante o processo de cura com a formação da metamioglobina, a presença de íons Fe^{+2} e a ação do nitrito de sódio iniciam a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio (O_2) e do radical ferromioglobina (Fe_4), resultante da reação entre o metamioglobina e H_2O_2 (ESTÉVEZ; CAVA, 2006), desta forma, tendo como resultado a formação do radical peróxido (BATIFOULIER et al., 2002). Todos esses compostos estão associados à concentração de NaCl, e durante o processamento do salame, o tempo e a temperatura do salame ainda não curado, iniciam a oxidação dos lipídeos e proteínas, sendo que isso pode ser verificado logo após o embutimento do salame.

Segundo Starke-Reed e Oliver (1989) enzimas proteolíticas podem ser inativadas pela oxidação. Pode-se descrever o mecanismo da oxidação protéica como uma reação em cadeia de radicais livres semelhante à oxidação lipídica, porém com uma maior complexidade e uma maior variedade de produtos de oxidação (LUND et al., 2011).

Segundo Cichoski (2011) a reação de Maillard poderia promover também uma redução nos valores de carbonila, devido ao fato dos compostos de carbonila (formada através da oxidação da proteína) reagirem com o grupo NH_2 , durante a ação das enzimas endógenas. O alto índice de oxidação de proteínas somada com a concentração de sal (redução da Atividade de água (Aw) com valores entre 0,86 a 0,82) podem também reduzir a proteólise (XIONG, 2000; CICHOSKI, 2011).

A oxidação lipídica e protéica pode comprometer a qualidade sensorial dos produtos, pois os aminoácidos livres submetidos a transformações químicas produzem vários compostos, incluindo aminas, cetoácidos, ácidos orgânicos e amônia, que afetam as características sensoriais do alimento e, em alguns casos, com propriedades indesejáveis ou podem mesmo dar origem a compostos tóxicos (ANSORENA; ASTIASARÁN, 2004).

1.1.5 Compostos voláteis em produtos fermentados com baixo teor de sal

O flavor (aroma e sabor) característico dos produtos cárnicos curados são determinados pelos ingredientes adicionados (especiarias, alho, vinho e etc) assim como pelo adequado balanço entre os compostos não voláteis (peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, açúcares, etc.) e os compostos voláteis (aldeídos, cetonas, alcoóis, furanos e etc.) resultantes do catabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. A proteólise desempenha um papel importante não só na maturação da carne, como no desenvolvimento do flavor característico. A degradação de proteínas é atribuída principalmente às proteínas endógenas e posterior degradação de peptídeos e aminoácidos livres é realizada por enzimas musculares e microbianas (NISHIMURA, 2002).

A sensação do flavor em salames é muito complexa, pois é o resultado da presença dos compostos voláteis e não voláteis nos alimentos que interagem entre si (ANTONI, 1998). Outro fator decisivo para a qualidade sensorial do produto é a degradação de proteínas, e na formação de compostos aromáticos (ORDÓÑEZ et al., 1999), influenciam na percepção e liberação de sabor (PÉREZ-JUAN et al., 2007).

A percepção do aroma nos produtos cárneos depende da concentração e do limiar de odor dos compostos voláteis e a suas interações com outros componentes dos alimentos, que irá afetar suas concentrações de gases voláteis (GUICHARD, 2002). O efeito do uso de diferentes misturas de sais (NaCl , KCl , MgCl_2 e CaCl_2) sobre os compostos voláteis foi reportado por Pérez-Juan et al. (2007). KCl produziu um efeito similar ao NaCl , aumentando a concentração dos compostos voláteis do *headspace* em 5-10 vezes, enquanto MgCl_2 e CaCl_2 não produziram um efeito similar de substituição.

As substituições de NaCl por KCl produzem significantes reduções na habilidade de os extratos de proteínas sarcoplasmáticas se ligarem aos aldeídos ramificados, como o hexanal e metional, enquanto nenhum efeito foi produzido em octanal e 2-pentanal. Os efeitos de MgCl_2 e CaCl_2 foram muito menores, mesmo em forças iônicas elevadas, com exceção dos aldeídos

ramificados, onde a presença de $MgCl_2$ produziu uma completa liberação de compostos voláteis. Diante destes resultados, é evidente que a substituição de NaCl pelos outros sais deve ser considerado, não somente pelo efeito da retirada do NaCl (flavor), senão também pela habilidade de ligar proteínas (PÉREZ-JUAN et al., 2006).

1.2 Justificativa

Nos últimos anos, surgiu uma crescente demanda por alimentos microbiologicamente seguros, minimamente processados, com menos aditivos, com qualidade nutricional e com reduções significativas de sódio. Porém essas características não devem afetar de forma negativa a qualidade sensorial e microbiológica dos produtos. Para atingir este objetivo o uso de Bactérias Láticas (LAB) produtoras de bacteriocinas constituem uma alternativa altamente promissora e competitiva na inibição de patógenos e contaminantes. Por outro lado, os recentes avanços na ciência da carne em pesquisas com proteólise e identificação de compostos originados durante a maturação também podem contribuir para o desenvolvimento de cultura “starter” alternativa para embutidos fermentados com baixo teor de NaCl.

O perfil de peptídeos contém os componentes necessários para o desenvolvimento do flavor em produtos cárneos fermentados. Assim a buscade culturas iniciadoras, que além de produzir ácido láctico em produtos fermentados com baixo teor de sódio, também sejam capazes durante a fermentação e armazenamento de produzir peptídeos com impacto na qualidade higiênica e sensorial e também de grande utilidade para o desenvolvimento de novos produtos.

1.3 Objetivos

Este estudo teve por objetivo verificar a atividade *in vitro* de cepas de LAB bacteriocigênicas em combinação com cocos catalase positiva/coagulase negativa (CGC), para a sua posterior aplicação em embutidos fermentados tipo Salame Italiano, a fim de avaliar a sua produção dos compostos de aroma e sabor indispensáveis para o desenvolvimento de novas culturas starter adaptada para produtos com baixo teor de cloreto de sódio (NaCl)

1.3.1 Objetivos específicos

1. Pesquisar a viabilidade da produção de salame tipo Italiano com a adição de 1,0% de NaCl de forma isolada ou combinada com combinações de cloretos substitutos KCl e CaCl_2 , analisando seus efeitos sobre as características físico-químicas e sensoriais e assim selecionar a melhor combinação de sais para uso em salames com baixo teor de sódio
2. Utilizar uma nova abordagem relacionando a lipólise com a degradação de Strecker em um ambiente de produção de salames com baixo teor de NaCl, observando os seus efeitos na proteólise e na resposta sensorial dos consumidores, empregando SPME/HRGC-MS para analisar os voláteis, mais especificamente os aldeídos (hexanal, 2,4 decadienal, 3-metilbutanal e 2-metilbutanal)
3. Em um modelo experimental *in vitro*, *Beaker Sausage* (BS) analisar diferentes combinações de LAB com *S.vitulinus* GV318 (GCC), verificando a degradação da proteínas da carne e a formação de peptídeos e aminoácidos relacionados ao sabor com a finalidade de selecionar uma combinação mais adequada para uso em Salames com baixo teor de NaCl.
4. Comparar o salame com baixo teor de sódio desenvolvido com quatro amostras comerciais, mensurando-se a expectativa gerada pelas alegações de saúde sobre o consumo de produtos com o baixo teor de sódio; o impacto da redução do sódio sobre a aceitação e buscar direcionadores para uma melhoria na formulação em função da aceitação do consumidor.

Referências

ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Effect of storage and packaging on fatty acid composition and oxidation in dry fermented sausages made with added olive oil and antioxidants. **Meat Science**, Barking, v. 67, p. 237-244, 2004.

ANTONI, I. **Desenvolvimento de um embutido fermentado de carne de peru pelo método QFD (Quality function Deployment)**. 1998. 110 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

BATIFOULIER, F.; MERCIER, Y.; GATELLIER, P.; RENERRE, M. Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H₂O₂ - activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle. **Meat Science**, Barking, v. 61, n. 4, p. 389-395, 2002.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Instrução normativa n.22, de 31 de Julho de 2000: regulamentos técnicos de identidade e qualidade de salame tipo italiano. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 ago. 2000. Seção 1, p. 15-28.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, Barking, v. 79, p. 483-499, 2008.

CICHOSKI, A.J.; ZIS, L.C.; FRANCESCHETTO, C. Características físico-químicas e microbiológicas da superfície do salame tipo italiano contendo solução de lactato de potássio. **Food Science and Technology**. Campinas, v. 29, n. 3, p. 546-552, 2009.

CICHOSKI, A.J.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, D.; GAIO, I.; SAGGIRATO, A.G. Lipid and protein oxidation in the internal part of Italian type salami containing basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 436-442, 2011.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 2005. 878 p.

DIAZ, O.; FERNANDEZ, M.; GARCIA DE FERNANDO, G.D.; DE LA HOZ, L.; ORDONEZ, J.A. Proteolysis in dry fermented sausages: the effect of selected exogenous proteases. **Meat Science**, Barking, v. 46, p. 115–128, 1997.

ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**, Barking, v. 72, n. 2, p. 348-355, 2006.

FADDA, S.; LÓPEZ, C.; VIGNOLO, G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as a sensorial and hygienic biomarkers. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 1, p. 66-79, 2010.

FADDA, S.; VIGNOLO, G.; HOLGADO, A.P.R.; OLIVER, G. Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. **Meat Science**. Barking, v. 49, n. 1, p. 1-18, 1998.

FLORES, J.; MARCUS, J.R.; NIETO, P.; NAVARRO, J.L. Effect of processing conditions on proteolysis and taste of dry-cured sausages. **Zetischrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A**, Belim, v. 204, p. 168-172, 1997.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **ANUALPEC 2014**:anuário da pecuária brasileira.São Paulo, 2014.271p.

GOUNADAKI, A.S.; SKANDAMIS, P.N.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.-J.E. Effect of packaging and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on sliced salami.**Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 10, p. 2313-2320, 2007.

GUICHARD, E. Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception.**Food Reviews International**, New York, v. 18, p. 49–70, 2002.

HELANDER, I.M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative.**Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 146-150, 1997.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 99, n. 6,p. 77-84, 2005.

IBAÑEZ, C.; QUINTANILLA, L.; CID, C.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum-Staphylococcus carnosus* part I: effect of partial replacement of NaCl with KCl on the stability and the nitrosation process. **Meat Science**, Barking, v. 44, p. 227–235, 1996.

LÜCKE, F.K. Fermented meat products.**Food Research International**, Barking, v. 27, p. 299-307, 1994.

LUND, M.N.; HEINONEN, M.; BARON, C.P.; ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in muscle foods: a review. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 55, p. 83-95, 2011.

MOLLY, K.; DEMEYER, D.; JOHANSSON, G.; RAEMAEKERS, M.; GHISTELINK, M.; GREENEM, I.The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages.**Food Chemistry**, London, v. 59, p. 539-545, 1997.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocins in food: a review. **Brazilian Journal Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 2, p. 120-127, 2008.

NISHIMURA, T. Influence of the peptides produced during post mortem conditioning on improvement of meat flavor. In: TOLDRA, F. (Ed.). **Research advances in the quality of meat and meat products**. Trivandrum: Research Singpost, 2002. chap. 4, p. 65-78.

ORDÓÑEZ, J.A.; HIERRO, E.M.; BRUNA, J.M.; De La HOZ, L. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 39, n. 4, p. 329-367, 1999.

PEARSON, M.; GILLET, T.A. **Processed meat**. New York: Chapman & Hall, 1999. 438 p.

PÉREZ-JUAN, M.; FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Model studies on the efficacy of protein homogenates from raw pork muscle and dry-cured ham in binding selected flavor compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4802-4808, 2006.

_____. Binding of aroma compounds by isolated myofibrillar proteins: effect of protein concentration and conformation. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 3, p. 932-939, 2007.

PHELPS, T.; ANGUS, F.; CLEGG, S.; KILCAST, D.; NARAIN, C.; DEN RIDDER, C. Sensory issues in salt reduction. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 17, p. 629-634, 2006.

RODRÍGUEZ, M.; NUÑEZ, F.; CÓRDOBA, J.J.; BERMÚDEZ, M.E.; ASENSIO, M.A. Evaluation of proteolytic activity of microorganisms isolated from dry cured ham. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 85, p. 905-912, 1998.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products: review. **Meat Science**, Barking, v. 70, p. 531-541, 2005.

SARCINELLI, M.F.; VENTURINI, K.S.; SILVA, L.C. **Produção de bovinos - tipo carne**. Alegre: UFES, Pro-Reitoria de Extensão, Programa Institucional de Extensão, 2007. 8p. (Boletim Técnico, 307).

STADTMAN, E.R. Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 423, n. 1, p. 2-5, 2004.

STAHNKE, L. Flavour formation in fermented sausage. In: TOLDRÁ, F. (Ed.). **Research advances in the quality of meat and meat products**. Trivandrum: Research Singpost, 2002. p. 193-223.

STARKE-REED, P.E.; OLIVER, C.N. Protein oxidation and proteolysis during ageing and oxidative stress. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 275, p. 559-567, 1989.

STILES, M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 70, p. 331-345, 1996.

TALON, R.; LEROY-SÉTRIN, S.; FADDA, S. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. In: TOLDRÁ, F. (Ed.). **Research advances in the quality of meat and meat products**. Trivandrum: Research Signpost, 2002. p.175–191.

TERRA, N.N. Particularidades na fabricação do salame. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 317, p.12-22, 2003.

TOLDRÁ, F. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. **Meat Science**. Barking, v. 67, p. 711-719, 1998.

_____. Biochemistry of fermented meat. In: _____. (Ed.). **Food biochemistry and food processing**. Ames:Blackwell, 2007. p.641-658.

XIONG, Y.X.; LOU, X.; HARMON, R.J.; WANG, C.; MOODY, W.G. Salt and pyrophosphate induced structural changes in myofibrils from chicken red and white muscles. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 1176-1182, 2000.

2 PERFIL SENSORIAL E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE SALAMES TIPO ITALIANO ELABORADOS COM BAIXO TEOR DE SÓDIO

Resumo

O objetivo do presente estudo foi desenvolver salames com baixo teor de sódio preparado com carne suína, carne bovina com baixo teor de gordura e uma pequena quantidade de toucinho suíno (150g/kg⁻¹). Cloreto de sódio (NaCl) e substitutos, tais como cloreto de potássio (KCl) e cloreto de cálcio (CaCl₂) foram testados para obter um salame com baixo teor de sódio e com características sensoriais semelhantes aos descritos no salames comerciais. Assim, sete formulações foram desenvolvidas, variando as combinações de sais entre 5gkg⁻¹ e 10g kg⁻¹. Foram considerados também dois tratamentos controle, um com elevado teor de NaCl (25g kg⁻¹) e outro com baixo teor de NaCl (10g kg⁻¹). Os resultados mostraram diferenças de pH e Aw, devido à redução de NaCl. As misturas substitutas de sal (KCl/CaCl₂) nos salames não afetaram tecnologicamente a elaboração de salames, e a substituição de NaCl por KCl + CaCl₂ diminuiu o teor de Na em 55% aproximadamente. Segundo o teste de consumidores, esta substituição não acarretou diferenças significativas ($p > 0,05$) na aparência (cor), no entanto encontrou-se diferença significativa ($p < 0,05$) no sabor, textura, e aceitação geral. Todos os tratamentos obtiveram escores sensoriais variando entre 6,2 e 7,5 (gostei ligeiramente" para "gostei moderadamente"). Em relação ao teor de sal nos salames, os consumidores consideraram os tratamentos com baixo teor de NaCl adicionados dos substitutos KCl e CaCl₂ como ideais. Assim, apresenta-se como viável a produção de salames com baixo teor de sódio, utilizando substitutos de sal (KCl e CaCl₂) ou salames sem substitutos com apenas 1,0% de NaCl.

Palavras-chave: Redução de sal;Análise com consumidores; Cloreto de potássio; Cloreto de cálcio;Penalty analysis

Abstract

The aim of the present study was to develop low sodium salami prepared with pork meat, low-fat beef meat and a small quantity of pork backfat (150g/kg). Sodium chloride (NaCl) replacers, such as potassium chloride (KCl) and calcium chloride (CaCl₂), were tested to obtain low-salt salami with sensory characteristics similar to those in commercial salamis. Seven formulations for salami were developed. Several combinations of salts ranging between 5 g kg⁻¹ and 10 g kg⁻¹ and control treatments with a high content of NaCl (25 g kg⁻¹) and one with a low content of NaCl (10 g kg⁻¹). The results showed differences in pH and Aw due to NaCl reduction. Salt replacement mixtures of KCl/CaCl₂ in salamis did not affect technologically the elaboration of salamis and the replacement of NaCl by KCl + CaCl₂ decreased Na content by approximately 55%. Consumer testing showed no differences ($p > 0.05$) in appearance (color) and there were differences ($p < 0.05$) in the flavor, texture, overall acceptance of the salami. All treatments obtained scores between 6.2 to 7.5("like slightly" to "like moderately"). Regarding salt

content of salami, consumers considered treatments with low NaCl content and replacers KCl and CaCl_2 as "ideal" saltiness. Thus, the production of low sodium salamis using salt replacers (KCl and CaCl_2) or salamis without replacers with only 1.0% of NaCl is viable.

Keywords: Salt reducing; Consumers testing; Penalty analysis; Potassium chloride; Calcium chloride

2.1 Introdução

Durante os últimos anos, as autoridades de saúde têm recomendado redução na ingestão de sódio (Na) devido à problemas associados com o consumo elevado de Na. A principal fonte de Na em dietas é cloreto de sódio (NaCl). Em geral, um consumo tradicional de mais de 6 g de NaCl/dia/pessoa está associado a problemas de saúde, tais como níveis elevados de pressão arterial, contribuindo assim para um aumento do risco de doenças cardiovasculares na população (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE -OMS/FAO, 2003; CHOI et al., 2014; DESMOND, 2006).

Dentre esses produtos, encontram-se os embutidos fermentados como por exemplo os salames, que possuem um alto valor agregado. No entanto, este produto é uma importante fonte de Na, devido ao fato de 1,5 a 3,0 % de NaCl ser adicionado durante a sua preparação e após a desidratação, ocorre ainda, o aumento da concentração de NaCl, podendo atingir valores entre 2,5 a 5,0 % (CICHOSKI et al., 2009; TOLDRÁ, 2007).

Durante a elaboração do salame, a maioria das mudanças físicas e bioquímicas ocorrem, começando com a desnaturação das frações das proteínas sarcoplasmáticas, com influência na solubilização de proteínas miofibrilares da carne (actina e miosina). Este processo bioquímico contribui para aumentar a firmeza de salame, começando no final da secagem e início do processo de maturação, contribuindo para aumentar a consistência e fatiabilidade do produto (BERIAN et al., 1993; BUCKENHUSKES, 1993)

A qualidade sensorial do salame com baixo teor de sódio desenvolvido nesta pesquisa inclui diferentes atributos sensoriais como a aparência, sabor e textura. Porém, a percepção do salgado tem a maior influência sobre a aceitação sensorial destes produtos. O teor de sal pode estar diretamente relacionado ao tipo de substituto de sal utilizado no

processo tecnológico de reformulação. Para avaliar a percepção de teor de sal em salames utilizou-se a escala "Just- about- right (JAR)" de modo a avaliar a intensidade percebida pelo consumidor, se está abaixo ou acima dos níveis ideais para esse atributo. Além disso, a diminuição da aceitabilidade associada com a diminuição do teor de sal foi analisada mediante a análise de penalização (POPPER, 2014). De acordo com Agudelo et al. (2015), a análise de penalização ajuda a identificar possíveis melhorias na qualidade sensorial dos produtos, identificando os níveis ideais de atributos, aumentando assim a sua aceitação.

Nesse contexto, este estudo pesquisou a viabilidade da produção de salame com a adição de 10g/kg de NaCl usando os substitutos do sal, KCl e CaCl_2 , avaliando seus efeitos sobre as características físico-químicas, qualidade sensorial e intenção de compra, bem como para analisar a percepção dos consumidores em relação a teor de sal nos diferentes tratamentos propostos.

2.2 Material e métodos

2.2.3 Tratamentos

Os tratamentos foram preparados com cinco níveis de substituição de NaCl por KCl misturado com CaCl_2 . Dois controles foram considerados, um controle foi preparado com níveis normais de 25 g kg^{-1} NaCl (CH) e outro controle com a adição de 10 g kg^{-1} de NaCl (CL) sem substitutos (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Níveis de substitutos /redução de NaCl nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Quantidade de sais adicionados em g kg^{-1}		
	Cloreto de sódio (NaCl)	Cloreto de potássio (KCl)	Cloreto de cálcio (CaCl_2)
T1	10,0	5,0	5,0
T2	10,0	4,5	4,5
T3	10,0	4,0	4,0
T4	10,0	3,5	3,5
T5	10,0	2,5	2,5
CH	25,0	0,0	0,0
CL	10,0	0,0	0,0

T1 - 10 g kg^{-1} NaCl + 5 g kg^{-1} KCl + 5 g kg^{-1} CaCl_2 ; T2 - 10 g kg^{-1} NaCl + 4.5 g kg^{-1} KCl + 4.5 g kg^{-1} CaCl_2 ; T3 - 10 g kg^{-1} NaCl + 4 g kg^{-1} KCl + 4 g kg^{-1} CaCl_2 ; T4 - 10 g kg^{-1} NaCl + 3.5 g kg^{-1} KCl + 3.5 g kg^{-1} CaCl_2 ; T5 - 10 g kg^{-1} NaCl + 2.5 g kg^{-1} KCl + 2.5 g kg^{-1} CaCl_2 ; CH - 25 g kg^{-1} NaCl; CL - 10 g kg^{-1} NaCl.

2.2 Processo de produção

As matérias-primas utilizadas neste experimento foram adquiridas de um frigorífico sob inspeção federal (Frigorífico Angelelli, Brasil). Dois processos de produção de salame foram realizados no Laboratório de Qualidade e Processamento da Carnes da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”(ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP). O salame italiano foi preparado com a paleta suína (600g kg^{-1}), acém bovino (250g kg^{-1}) e toucinho (150g kg^{-1}) da região lombar de suínos. A carne bovina e suína refrigerada foram pesadas e cortadas para serem posteriormente moídas (separadamente) usando um moedor (HOBART 4B22-2) com discos de aço inoxidável número 10, 5, e 8 mm para carne suína, bovina e toucinho, respectivamente. Inicialmente, foi adicionado no misturados a carne suína, carne bovina, seguido de toucinho, respectivamente. Após a mistura da carne crua, foram adicionados os ingredientes não cárneos como NaCl, seguido pelos cloretos substitutos KCl e CaCl_2 , de acordo com a formulação mostrada na Tabela 1.

Na sequência, os seguintes ingredientes foram adicionados à mistura de carne em cada tratamento: nitrito ($0,15\text{g kg}^{-1}$) e nitrato de sódio ($0,15\text{g kg}^{-1}$), eritorbato de sódio ($3,0\text{g kg}^{-1}$), condimentos ($7,0\text{g kg}^{-1}$), dextrose ($0,70\text{g kg}^{-1}$) e uma cultura "starter" comercial ($0,25\text{g kg}^{-1}$; Bactoferm t-SPX Chr.Hansen) contendo *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*. A massa de carne foi embutida em tripa de colágeno reconstituído medindo 45 mm de diâmetro. Os salames foram padronizados em tamanho de 400 g cada e acondicionados em hastes de metal e colocadas em uma câmara de fermentação a 23 ± 1 °C durante 48 h, com umidade relativa variando entre 85 e 90% até atingir um pH entre 4,9 e 5,2. Após esse período os parâmetros da câmara foram alterados para a secagem e maturação, dos salames, atingindo uma temperatura de 16-18 °C e uma umidade relativa de 65-75%.

Os salames permaneceram nessas condições por 26 dias até atividade de água estar entre 0,88-0,92 para todos os tratamentos. Em seguida, os invólucros foram removidos e os salames foram embalados sob vácuo e refrigerados a 7 ± 1 °C até o momento da análise.

2.3 Delineamento experimental

Para coleta dos dados físico-químicos, utilizou-se um delineamento em blocos completos, considerando cada processamento como um bloco ($N = 2$). Cada tratamento foi processado em replicata, sendo divididos em: T1 com $10\text{g kg}^{-1}\text{NaCl} + 5\text{g kg}^{-1}\text{KCl}$ e $5\text{g kg}^{-1}\text{CaCl}_2$; T2 com $10\text{g kg}^{-1}\text{NaCl} + 4.5\text{g kg}^{-1}\text{KCl}$ e $4.5\text{g kg}^{-1}\text{CaCl}_2$; T3 – $10\text{g kg}^{-1}\text{NaCl} + 4\text{g kg}^{-1}\text{KCl} + 4\text{g kg}^{-1}\text{CaCl}_2$; T4 – $10\text{g kg}^{-1}\text{NaCl} + 3.5\text{g kg}^{-1}\text{KCl} + 3.5\text{g kg}^{-1}\text{CaCl}_2$; T5 – $10\text{g kg}^{-1}\text{NaCl} + 2.5\text{g kg}^{-1}\text{KCl} + 2.5\text{g kg}^{-1}\text{CaCl}_2$; CH – $25\text{g kg}^{-1}\text{NaCl}$; CL – $10\text{g kg}^{-1}\text{NaCl}$. Para gerar dados sensoriais, um delineamento experimental quadrado latino foi utilizado, considerando efeitos de ordem de apresentação das amostras.

2.4 Análises físico-químicas

A medida de pH foi determinada por um pHmetro portátil calibrado (Oakton pH 300, série 35618, Vernon Hills, Illinois, EUA), com compensação automática de temperatura e um eletrodo com uma sonda de penetração (Digimed, São Paulo, Brasil). A análise foi realizada no início do processo de fabricação (antes de embutimento), depois da fermentação (48 h), e no final do processamento (28 dias). As amostras foram analisadas em triplicata.

Atividade de água (A_w) de amostras de salame foi determinada utilizando um medidor de atividade de água 4T Aqualab (Decagon Devices Inc., Pullman, EUA) no início do processo de produção (antes do embutimento) e no final do processamento (28 dias). As fatias de salame, com cerca de 3 mm de espessura, foram acondicionadas em cápsulas adequadas para análise, com exceção do salame cru, que foi espalhado antes da análise no fundo das cápsulas usando uma espátula.

Os teores de Na (AOAC, 2005), o conteúdo lipídico (método Soxhlet), o teor de umidade (AOAC, 2005) e o de proteína total (AOAC, 2005) foram determinados no final do tratamento (28 dias). Três salames por tratamento foram utilizados para avaliação e cada análise foi realizada em triplicata.

2.5 Análise do consumidor

Consumidores de diferentes idades (21-60 anos) e de diferentes regiões do país foram recrutados na ESALQ - USP, em Piracicaba, Brasil. Os 52 consumidores recrutados relataram uma frequência regular com relação ao consumo de salame. As análises sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial na ESALQ. Os consumidores foram colocados para degustação em cabines individuais, onde receberam instruções sobre a utilização da escala, da natureza dos produtos e do tipo de avaliação a ser realizada.

Amostras dos sete salames em estudo foram servidas de forma monádica de acordo com o delineamento experimental quadrado latino e foram avaliadas sob luz branca em pratos brancos de plástico descartável, codificadas com números aleatórios de três dígitos. Durante a avaliação sensorial, foi dado um intervalo de duas horas entre a 4ª e 5ª amostras para evitar a fadiga sensorial. Água mineral e biscoito sem sal foram usadas para limpar o palato entre as amostras.

Após avaliação da aparência, os consumidores foram convidados a provar o produto e avaliar o quanto eles gostaram ou não de cada amostra em termos de textura, sabor e aceitação global, utilizando uma escala hedônica de nove pontos (1 = desgostei muitíssimo, 5 = Nem gostei nem desgostei, 9 = gostei muitíssimo) (MEILGAARD et al., 2007). Depois disso, os consumidores avaliaram o teor de sal das amostras por meio da escala JAR (7 = muito acima do ideal, 4 = ideal e 1 = muito baixo do ideal) (POPPER, 2014). Finalmente, os consumidores avaliaram sua intenção de compra para os produtos testados por meio de uma escala estruturada de cinco pontos (1 = certamente não compraria, 3 = posso ou não comprar e 5 = certamente compraria). Este estudo foi registrado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ESALQ - USP sob o protocolo nº 104/2012.

2.6 Análises Estatísticas

As medições físico-químicas dos tratamentos experimentais foram analisados mediante ANOVA de uma via ($p \leq 0,05$). As respostas de aceitação dos atributos avaliados foram analisados utilizando uma ANOVA de três vias ($p \leq 0,05$), onde foi considerado no modelo estatístico os efeitos do

consumidor, a ordem de apresentação das amostras e as amostras. Os resultados JAR foram analisadas usando a análise penalização mediante o software XLSTAT (Addinsoft, New York, EUA). Para avaliar as diferenças nas características físico-químicas e aceitação entre as amostras, as comparações das médias foram realizadas pelo teste de Tukey HSD ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software SAS e Statistica™ (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EUA).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Análises físico-químicas

As características físico-químicas dos salames produzidos com teor reduzido de NaCl e com o uso de combinações de cloretos substitutos KCl e CaCl_2 estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2-Médias ($\pm$ Desvpad) da Aw e do pH nos tratamentos durante a produção do salame

Tratamentos	Aw		pH		
	Início produção	Final maturação	Início produção	Após fermentação	Final maturação
T1	0,97 ^a $\pm$ 0,01	0,91 ^b $\pm$ 0,01	5,9 ^a $\pm$ 0,04	5,0 ^a $\pm$ 0,08	5,1 ^a $\pm$ 0,08
T2	0,97 ^a $\pm$ 0,01	0,91 ^b $\pm$ 0,01	5,9 ^a $\pm$ 0,12	5,0 ^a $\pm$ 0,11	5,1 ^a $\pm$ 0,01
T3	0,97 ^a $\pm$ 0,01	0,91 ^b $\pm$ 0,01	5,9 ^a $\pm$ 0,19	5,0 ^a $\pm$ 0,05	5,2 ^a $\pm$ 0,06
T4	0,97 ^a $\pm$ 0,01	0,91 ^b $\pm$ 0,01	5,9 ^a $\pm$ 0,26	5,0 ^a $\pm$ 0,04	5,2 ^a $\pm$ 0,10
T5	0,97 ^a $\pm$ 0,01	0,91 ^b $\pm$ 0,01	5,8 ^a $\pm$ 0,04	5,0 ^a $\pm$ 0,04	5,2 ^a $\pm$ 0,06
CL	0,98 ^a $\pm$ 0,01	0,91 ^b $\pm$ 0,01	6,0 ^a $\pm$ 0,08	5,1 ^a $\pm$ 0,19	5,3 ^a $\pm$ 0,05
CH	0,96 ^b $\pm$ 0,01	0,89 ^a $\pm$ 0,01	5,9 ^a $\pm$ 0,10	5,0 ^a $\pm$ 0,05	5,2 ^a $\pm$ 0,02

Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. Médias dentro da mesma coluna, seguido pelas mesmas letras não mostraram qualquer diferença significativa ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey. Foram utilizados os seguintes tratamentos: T1 - 10 g kg^{-1} NaCl + 5 g kg^{-1} KCl + 5 g kg^{-1} CaCl_2 ; T2 - 10 g kg^{-1} NaCl + 4,5 g kg^{-1} KCl + 4,5 g kg^{-1} CaCl_2 ; T3 - 10 g kg^{-1} NaCl + 4 g kg^{-1} KCl + 4 g kg^{-1} CaCl_2 ; T4 - 10 g kg^{-1} NaCl + 3,5 g kg^{-1} KCl + 3,5 g kg^{-1} CaCl_2 ; T5 - 10 g kg^{-1} NaCl + 2,5 g kg^{-1} KCl + 2,5 g kg^{-1} CaCl_2 ; CH - 25 g kg^{-1} NaCl; CL - 10 g kg^{-1} NaCl.

A atividade de água (Aw) antes do embutimento variou de 0,96 a 0,97, com diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). O Tratamento CH mostrou Aw inferior quando comparado aos outros tratamentos, devido à maior quantidade de NaCl (em torno de 55%) neste tratamento. No entanto, essa diferença causada pela redução de NaCl e

adição dos cloretos substitutos KCl / CaCl em salames não afetou tecnologicamente a fase inicial do processo.

Esta diferença da A_w em todos os tratamentos em comparação com CH manteve-se ao longo da fermentação, secagem e períodos de maturação de salame (Tabela 2.2), demonstrando que o tratamento CH obteve valores mais baixos de A_w (0,89) quando comparado com os demais tratamentos. Assim, após a maturação no final da produção dos salames, os mesmos apresentaram valores A_w dentro dos limites exigidos pela legislação brasileira (A_w máximo: 0,92). Ressalta-se que a A_w deve estar em níveis baixos e seguros, devido ao fato de esta ser uma das principais barreiras para o crescimento de microrganismos indesejáveis no salame.

Com esse resultado, observa-se que os tratamentos com redução de NaCl e substitutos por uma mistura de KCl/CaCl₂ foram estáveis durante a produção do salame. O tratamento CL (10gkg⁻¹), encontra-se no limiar tecnológico de produção segundo Pardiet al. (2007), entretanto o comportamento da queda da A_w foi similar aos demais tratamentos, com exceção ao CH.

Durante a fabricação, o desenvolvimento de todas as amostras (Tabela 2.2) observou-se valores de pH inicial entre 5,9-6,0 e depois da fermentação (60 horas) o pH do controle e outros dos tratamentos atingiram valores inferiores a 5,1. A rápida fermentação é desejável na produção de salame, porém nesta pesquisa, foi utilizada uma temperatura de fermentação mais amena e, conseqüentemente, um período de fermentação mais longo influenciando no pH anteriormente mencionado. Esta redução ideal do pH (pH inferior a 5,2 com 24-60 h de fermentação) é extremamente importante para os produtos fermentados à base de carne, devido ao fato do ácido láctico inibir um grande número de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, provocar o início da proteólise e auxiliar o início da secagem do salame. Isto é porque pH baixo faz com que a proteína atinja o seu ponto isoelétrico e, conseqüentemente, a redução da capacidade de retenção de água, fazendo com que ocorra a perda de água mais fácil no salame, facilitando assim a sua desidratação (TOLDRÁ et al., 2007; LEROY et al., 2006).

Durante a fermentação, o ácido láctico é produzido devido à quebra dos carboidratos pelas bactérias lácticas adicionadas pela cultura starter

comercial e pelas bactérias presentes na carne. A quantidade utilizada de carboidratos (0,7 g/ kg) foi suficiente para a produção da fermentação desejada, com valores de pH perto de 5,0, semelhantes às relatados por Del Nobile et al. (2009); Lücke (1994). No final do processo, de produção e maturação, os valores de pH aumentaram para 5,3. Estes valores foram observados em todos os tratamentos e são considerados típicos da maturação do salame tipo italiano, devido à formação de compostos básicos de nitrogênio não protéico (NPN), além do efeito tampão da proteína (ASTIASARÁN et al., 1990).

Na atual pesquisa, para diminuir o impacto da redução de Na na textura do salame, optou-se por uma menor adição de lipídios, cerca de 28% e aumentou-se a adição de carne magra, cerca de 25%, o que pode ser comprovado pelo elevado teor de proteínas em todos os tratamentos (entre 30,6- 31,8%). No entanto, o teor de umidade entre todos os tratamentos permaneceu entre 33-37%, o que poderia ser um pouco menor para melhorar a textura no salame, deixando-o mais firme, considerado ideal pelos consumidores. Em todos os tratamentos, a redução de NaCl e adição da mistura dos cloretos substitutos KCl/CaCl₂ (T1-T5), com relação a tecnologia, foi satisfatório para a produção de salame com boas características. No entanto, existe a necessidade de ajustes ao processo tecnológico, tais como proteína, quantidade de gordura e de conteúdo de umidade, a fim de otimizar o processo de produção de salame. Todos os tratamentos (T1-T5, CH e CL) têm valores dentro dos limites indicados pelo padrão brasileiro No. 22 de 31 de Julho de 2000, para tipo Salame italiano (BRASIL, 2000).

No presente estudo, a substituição de NaCl por diferentes misturas de sais de cloreto KCl + CaCl₂ reduziu significativamente o teor de Na nos produtos. O tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e CL, apresentaram teores de Na entre 865-898 mg/100g enquanto o tratamento CH obteve 2452 mg/100g. Assim, a substituição de NaCl por combinações de KCl + CaCl₂ resultou em uma redução de aproximadamente 63% no teor de Na.

No mercado brasileiro, para o salame tipo italiano encontram-se teores de Na entre 1612 mg Na/100g a 2562 mg Na/100g. Portanto, a comercialização de um produto com baixo teor de sódio é uma boa opção para a indústria e os consumidores. No entanto, uma redução de sal, a este

nível é considerado crítico por causa da contaminação microbiana ou risco da heterofermentação durante o processo de fermentação do salame (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005). Nesta pesquisa foi escolhida uma substituição com misturas de cloretos ($\text{KCl} + \text{CaCl}_2$), em vez de uma substituição de apenas um tipo de cloreto, porque outros autores (CAMPAGNOL et al., 2012) reportaram que a substituição de NaCl por KCl (50%) não causou alterações significativas na fermentação e desidratação de salames, no entanto diminuiu a qualidade sensorial dos seus salames.

2.3.2 Estudo com consumidor

Teste com consumidor

A ANOVA dos dados de aceitação não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) na aparência (cor) de salame (Tabela 3.2). No entanto, houve diferenças ($p < 0,05$) em sabor, textura e aceitação global. Todos os tratamentos obtiveram escores entre 5,9-7,5, e uma média de aceitação entre "gostei ligeiramente" para "gostei moderadamente" para todos os atributos. Isso mostra uma boa aceitação dos salames e que os provadores observaram diferenças no teor de sal, portanto, na intenção de compra.

Tabela 2.3- Valores de aceitação dos atributos cor, sabor, textura, aceitação geral, teor de sal e intenção de compra para os tratamentos em estudo

Atributo	CH	CL	T1	T2	T3	T4	T5
Aparência	7,3 ^a ±1,2	7,4 ^a ±1,4	7,0 ^a ±1,4	7,0 ^a ±1,3	7,5 ^a ±1,1	7,1 ^a ±1,3	7,3 ^a ±1,3
Sabor	7,2 ^a ±1,9	6,2 ^b ±1,9	5,9 ^b ±1,9	6,2 ^b ±1,7	6,5 ^{ab} ±1,8	6,3 ^{ab} ±1,5	6,8 ^{ab} ±1,8
Textura	7,5 ^a ±1,2	6,7 ^b ±1,5	6,2 ^b ±1,8	6,3 ^b ±1,6	6,6 ^b ±1,7	6,3 ^b ±1,6	6,7 ^b ±1,5
Aceitação global	7,4 ^a ±1,4	6,5 ^b ±1,5	6,3 ^b ±1,7	6,4 ^b ±1,5	6,6 ^b ±1,5	6,4 ^b ±1,4	6,9 ^{ab} ±1,5
Teor de sal	4,3 ^a ±1,2	3,6 ^b ±1,1	4,0 ^{ab} ±1,3	3,5 ^b ±1,1	4,0 ^{ab} ±1,1	3,8 ^b ±1,4	3,9 ^{ab} ±1,1
Intenção de compra	3,9 ^a ±1,1	3,2 ^b ±1,1	2,9 ^b ±1,2	3,1 ^b ±1,2	3,2 ^b ±1,2	3,0 ^b ±1,1	3,4 ^{ab} ±1,2

T1 - 10 g kg⁻¹ NaCl + 5 g kg⁻¹ KCl + 5 g kg⁻¹ CaCl₂; T2 - 10 g kg⁻¹ NaCl + 4,5 g kg⁻¹ KCl + 4,5 g kg⁻¹ CaCl₂; T3 - 10 g kg⁻¹ NaCl + 4 g kg⁻¹ KCl + 4 g kg⁻¹ CaCl₂; T4 - 10 g kg⁻¹ NaCl + 3,5 g kg⁻¹ KCl + 3,5 g kg⁻¹ CaCl₂; T5 - 10 g kg⁻¹ NaCl + 2,5 g kg⁻¹ KCl + 2,5 g kg⁻¹ CaCl₂; CH - 25 g kg⁻¹ NaCl; CL - 10 g kg⁻¹ NaCl.

O sabor foi afetado negativamente pela redução de NaCl e substituição com misturas de KCl/CaCl_2 . Os resultados mostraram que a adição da mistura 4 g kg⁻¹ CaCl_2 + 4 g kg⁻¹ KCl , produziu sabor desagradável, o que interfere negativamente no sabor do salame (Tabela 2.3). Em relação

atextura, os consumidores relataram falta de coesividade causada pela redução de NaCl e os tratamentos com a redução deste ingrediente apresentaram menores escores em todos os tratamentos em comparação com CH. A mesma tendência foi observada na aceitação global dos consumidores que gostaram menos dos tratamentos com redução de NaCl e substituição por KCl/CaCl₂ em comparação com CH.

Esta tendência pode ser atribuída à presença de KCl ou do CaCl₂ ou da misturas desses sais. Eles afetaram a atividade de enzimas lipolíticas, alterando o sabor dos produtos fermentados. Além disso, a adição de KCl e CaCl₂ em produtos à base de carne é limitado pelo sabor amargo, sabor metálico e sensação adstringente que elevadas quantidades destes sais fornecem aos produtos cárneos (RIPOLLÉS et al., 2011; BLESA et al., 2008).

O tratamento CH é o padrão para produtos disponíveis no mercado, e o tratamento T5 (1,0% NaCl + 0,25% KCl + 0,25% de CaCl₂) obteve as pontuações mais próximas de CH (2,5% de NaCl) para o sabor, textura, e aceitação global. Isto mostra que a adição de 0,25% de KCl + 0,25% de CaCl₂, nas condições propostas foram suficientes para mascarar o baixo teor de NaCl (1,0%). No tratamento T5, as pontuações da aceitação relacionadas ao sabor e textura foram mais elevadas do que as obtidas por Campagnol et al. (2012) em um tratamento com 50% de redução de Na e dessubstituição com KCl. A aceitação global obtida em nosso estudo foi maior que a relatada por GIMENO et al., (1998) para salames produzidos com baixo teor de sódio (formulação 1,0% NaCl, 0,55% KCl, 0,23% MgCl₂ e 0,46% CaCl₂) que obteve uma aceitação total 37% menor. Pode-se ressaltar que neste estudo, o salame T5 tinha 63% de redução de Na, levando a um teor final de NaCl de 25g kg⁻¹ após um período de 28 dias de secagem e maturação. Assim, uma vez que o conteúdo de Na nos produtos atualmente disponíveis no mercado atingem até 6g kg⁻¹ (JIMÉNEZ-COLMENERO et al., 2001), a redução do teor de NaCl em produtos secos e fermentados continua sendo o principal desafio para a investigação laboratorial.

Escala JAR

A escala JAR é convencionalmente usada para identificar atributos sensoriais o qual não conseguiu produzir uma condição ideal para o consumidor. A suposição implícita é que a escala JAR pode ser usada para diagnosticar a natureza de um problema sensorial, os direcionadores para a reformulação e a magnitude para sua correção (RODRÍGUEZ-GARCÍA et al., 2014). Os resultados foram analisados pela análise de penalização em que as respostas á escala JAR dimensiona a aceitação global. Nesta análise, um atributo foi considerado significativo quando a percentagem de consumidores perceberam uma resposta diferente do ideal superior a 20%.

De acordo com a Figura 2.1, a redução de aceitabilidade relacionada com a porcentagem de consumidores em cada tratamento foi descrito de forma diferente em relação ao teor de sal usando as escalas JAR. Para a maioria dos tratamentos, com exceção de CH (com $25\text{g kg}^{-1}\text{NaCl}$), o teor de sal abaixo do ideal provocou uma maior queda na aceitabilidade. Por outro lado, o teor de sal acima do ideal não influenciou fortemente à redução de aceitabilidade (menos de 1 ponto em uma escala hedônica de 9 pontos). Isto mostra que a percepção do teor de sal ("salgado") abaixo do ideal é um ponto crítico e provoca redução na aceitabilidade de mais do que um ponto numa escala de 9 pontos (Figura 2.1).

Em relação ao teor de sal, os consumidores consideraram o tratamento com redução de NaCl, sem a adição de substitutos (KCl e CaCl_2) como "ligeiramente menos salgado do que o ideal" e "ideal". Isto deve-se a que os consumidores deste tipo de produto estão utilizando valores acima de 1600 mg Na/100 g, o qual é provavelmente superior ao ideal.

Figure 2.1– Queda da aceitação percebida pelos consumidores usando a escalaJAR

Com os dois tratamentos controle propostos (CL e CH) neste estudo, CH foi considerado com teor ideal de sal e CL com um teor mais baixo que o ideal considerando todos os tratamentos. Isto mostra que a redução de NaCl em salame é um problema complexo do ponto de vista sensorial, porque os consumidores deste tipo de produto procuram um sabor de sal elevado e consideram que é uma característica típica e marcante do produto. Quando o consumidor escolhe o tipo de salame ou marca para compra, procura um produto com sabor mais forte de sal, o que pode ser observado neste estudo quanto a elevada aceitação do CH e na intenção de compra (Figura 2.2), em que 74% dos consumidores consideravam este salame com a quantidade ideal de sal (CH).

A análise de penalidade aplicada aos consumidores e a cada amostra fornece informações sobre a importância do sal. Isto deve ser considerado como uma base para as alterações na composição dos produtos para melhorar a sua aceitabilidade.

Figure 2.2 - Intenção de compra dos salames testados

Nos tratamentos com substitutos do sal (T1, T2, T3, T4 e T5), a porcentagem de rejeição ficou entre 25-35% (certamente não compraria) e, nesse sentido pode concluir-se que os substitutos, nas quantidades

adicionadas, produziu um sabor ou aroma que fez o consumidor rejeitar estes salames. Isto também pode ser confirmado pelas informações escritas pelos consumidores na ficha sensorial sobre a intenção de compra assim como na baixa rejeição para os tratamentos com menor adição de substituições (tratamento T5 = $2,5\text{g kg}^{-1}$ de KCl + $2,5\text{g kg}^{-1}$ de CaCl_2) e sem substituições (CL). Outro ponto que deve ser considerado é o tipo de formulação utilizada. Optou-se por uma formulação mais condimentada e uma maior utilização de carne magra, que não é um padrão neste tipo de produtos. De acordo com Campagnolet al. (2011a), a condimentação possui uma forte influência no resultado final de salames com baixo teor de sódio.

Em nosso estudo, bem como estudos publicados, uma alternativa para diminuir o conteúdo de sódio nos salames, seria uma baixa adição de sais de cloreto utilizados como substitutos (0,25% cada) combinados com outras tecnologias, como por exemplo, maior condimentação aromatizante (especiarias, tais como a cebola, o alho, cominho, páprica e outros), novas culturas iniciadoras mais proteolíticas (LEROY; De VUYST, 2004), glutamato monossódico, dissódico inosinato, guanilato dissódico e aminoácidos (lisina e taurina) (SANTOS et al., 2014; CAMPAGNOL et al., 2011a, 2012) e extrato de levedura (CAMPAGNOL et al., 2011b). Com isto, pode-se reduzir o teor de Na em salames, obtendo-se um produto com apenas 10 g de NaCl/kg, com características aceitáveis para os consumidores, de custo relativamente baixo. Alguns autores (GUARDIA et al., 2006) descrevem a viabilidade de se produzir salames com somente 11 g de NaCl/kg.

2.4 Conclusão

Este estudo permitiu obter salames com 63% de redução de Na, bem aceito pelos consumidores. A baixa adição de cloretos substitutos mostrou aceitação sensorial mais próxima do salame com conteúdo de Na característico do salame comercial. A produção de salame com apenas 1,0% de NaCl, sem a adição de cloretos substitutos é viável, no entanto, o consumidor tem uma tendência a procurar por salames com sabores mais salgados no momento da compra.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Projeto 2012/07113-2. Gostaríamos também de agradecer a Christian Hansen, IBRAC e Cryovac que forneceram as culturas iniciadoras, aditivos e embalagens, respectivamente.

Referências

AGUDELO, A.; VARELA, P.; FISZMAN, S. Fruit fillings development: a multiparametric approach. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 61, n. 2, p. 564-572, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Rockville, 2005. 2200 p.

ASTIASARAN, I.; VILLANUEVA, R.; BELLO, J. Analysis of proteolysis and protein insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage. **Meat Science**, Barking, v. 28, p. 111-117. 1990.

BERIAÍN, M.J.; PEÑA, M.P.; BELLO, J. A study of the chemical components which characterize Spanish saucisson. **Food Chemistry**, London, v. 4, n. 48, p. 31-37, 1993.

BLESA, E.; ALIÑO, M.; BARAT, J.M.; GRAU, R.; TOLDRÁ, F.; PAGÁN, M.J. Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other. **Meat Science**, Barking, v. 78, p. 135-142, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade de Qualidade de Salames. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 ago. 2000. p. 15-28.

BUCKENHÜSKES, H.J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, New York, v. 12, p. 253-272, 1993.

CAMPAGNOL, P.C.B.; SANTOS, B.A. dos; TERRA, N.N.; POLLONIO, M.A.R. Lysine, disodium guanylate and disodium inosinate as flavor enhancers in low-sodium fermented sausages. **Meat Science**, Barking, v. 91, p. 334-338, 2012.

CAMPAGNOL, P.C.B.; SANTOS, B.A. dos; MORGANO, M.A.; TERRA, N.N.; POLLONIO, M.A.R. Application of lysine, taurine, disodium inosinate and disodium guanylate in fermented cooked sausages with 50% replacement of NaCl by KCl. **Meat Science**, Barking, v. 8, p. 239-243, 2011a.

CAMPAGNOL, P.C.B.; SANTOS, B.A. dos; WAGNER, R.; TERRA, N.N.; POLLONIO, M.A.R. The effect of yeast extract addition on quality of fermented sausages at low NaCl content. **Meat Science**, Barking, v. 87, p. 290-298, 2011b.

CHOI, Y.M.; JUNG, K.C.; JO, H.M.; NAM, K.W.; CHOE, J.H.; RHEE, M.S.; KIM, B.C. Combined effects of potassium lactate and calcium ascorbate as sodium chloride substitutes on the physicochemical and sensory characteristics of low-sodium frankfurter sausage. **Meat Science**, Barking, v. 96, n. 1, p. 21-25, 2014.

CICHOSKI, A.J.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, D.; GAIO, I.; SAGGIRATO, A.G. Lipid and protein oxidation in the internal part of Italian type salami containing basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, p. 436-442, 2011.

DEL NOBILE, M.A.; CONTE, M.; INCORONATO, A.L.; PANZA, O.; SEVI, A.; MARINO, R. New strategies for reducing the pork back-fat content in typical Italian salami. **Meat Science**, Barking, v. 81, p. 263-269, 2009.

DESMOND, E. Reducing salt: a challenge for the meat industry. **Meat Science**, Barking, v. 74, n. 1, p. 188-196, 2006.

GIMENO, O.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. A mixture of potassium, magnesium, and calcium chlorides as a partial replacement of sodium chloride in dry fermented sausages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 4372-4375, 1998.

GUÀRDIA, M.D.; GUERRERO, L.; GELABERT, J.; GOU, P.; ARNAU, J. Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. **Meat Science**, Barking, v. 73, p. 484-490, 2006.

JIMENEZ-COLMENERO, F.; CARBALLO, J.; COFRADES, S. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. **Meat Science**, Barking, v. 59, p. 5-13, 2001.

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

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 3, p. 270-285, 2006.

LÜCKE, F.K. Fermented meat products. **Food Research International**, Barking, v. 27, p. 299-307, 1994.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 464 p.

POPPER, R. Use of just-about-right in consumer research. In: VARELA, P.; ARES, G. Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 137-156.

RIPOLLÉS, S.; CAMPAGNOL, P.C.B.; ARMENTEROS, M.; ARISTOY, M.C.; TOLDRÁ, F. Influence of partial replacement of NaCl with KCl, CaCl₂ and MgCl₂ on lipolysis and lipid oxidation in dry-cured ham. **Meat Science**, Barking, v. 89, n. 1, p. 58-64, 2011.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, J.; SALVADOR, A.; HERNANDO, I. Replacing fat and sugar with inulin in cakes: bubble size distribution, physical and sensory properties. **Food and Bioprocess Technology**, Berlin, v. 7, n. 4, p. 964-974, 2014.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 3, p. 531-541, 2005.

SANTOS, B.A. dos; CAMPAGNOL, P.C.B.; MORGANO, M.A.; POLLONIO, M.A.R. Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine and taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with 50% and 75% replacement of NaCl with KCl. **Meat Science**, Barking, v. 96, p. 509-513, 2014.

TOLDRÁ, F.; NIP, W-K.; HUI, Y.H. Dry fermented sausages: an overview. In: TOLDRÁ, F. (Ed.). **Handbook of fermented meat and poultry**. Ames: Blackwell, 2007. p. 321-360.

WORLD HEALTH ORGANIZATION.FAO.**Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**.148 p.Geneva, 2003.(WHO Technical Reports Series,916).

3 ESTUDO DA REDUÇÃO DE NaCl EM SALAME E SUBSTITUIÇÃO COM MISTURAS DE KCl + CaCl₂ POR ANÁLISE SENSORIAL E SPME-HRGC/MS DOS VOLÁTEIS

Resumo

Em muitos países industrializados a ingestão de sódio excede as recomendações nutricionais. Uma alta ingestão de sódio tem sido associada com problemas de saúde, como hipertensão arterial e, conseqüentemente, um aumento do risco de doenças cardiovasculares. O objetivo deste trabalho foi analisar os aldeídos produto da lipólise e proteólise assim como a aceitação sensorial de salames com reduzido conteúdo de sódio. Foram elaboradas 4 formulações com substituição de NaCl por KCl + CaCl₂. Consideraram-se também 2 controles, com concentração alta e baixa de NaCl. Todas as amostras foram monitoradas em relação ao pH e atividade de água. Após foram determinados os compostos voláteis, especificamente o Hexanal, 2,4 decadienal, 3 metilbutanal e 2 metilbutanal. Um teste de aceitação sensorial foi conduzido com potenciais consumidores do produto. Os resultados mostraram a existência de uma relação entre a concentração de aldeídos e aceitação sensorial. Essa relação é uma ferramenta potencial para orientar os processos de reformulação em função da escolha da concentração dos cloretos substitutos que minimiza os efeitos adversos da redução do NaCl sobre a qualidade sensorial do salame

Palavras-chave: Cloreto de potássio; Cloreto de cálcio; Hexanal; 2,4 decadienal; 3 metilbutanal; 2 metilbutanal; Baixo teor de sódio

Abstract

In many industrialized countries, sodium intake exceeds nutritional recommendations. A high sodium intake has been linked to health problems such as hypertension and an increased risk of cardiovascular disease. The objective of this study was to analyze the lipolysis and proteolysis aldehydes products as well as sensory acceptance of salami with reduced sodium content. Four formulations were prepared with replacement of NaCl by KCl+CaCl₂, and were also obtained two controls, for high and low concentration of NaCl. All samples were monitored for pH and water activity. After the volatile compounds, mainly hexanal, 2,4 decadienal, 3 methylbutanal and 2 methylbutanal were determined. A sensory acceptance test was conducted with potential consumers of the product. The results showed the existence of a relationship between the concentration of aldehydes and sensory acceptance. This relationship is a potential tool to guide the reformulation process of choice of the concentration of chlorides substitutes that minimize the adverse effects of NaCl reduction on the sensory quality of the salami.

Keywords: Potassium chloride; Calcium chloride; Hexanal; 2,4 decadienal; 3 methylbutanal; 2 methylbutanal; Low-sodium

3.1 Introdução

Desde 1960, existe um intenso debate sobre o consumo excessivo de sódio e as implicações para a saúde pública, devido a conexão entre o excesso do consumo do sódio e o risco de doenças cardiovasculares (MENTE et al., 2014; World Health Organization (WHO), 2012). No Brasil, por influência da imigração dos europeus, incorporou-se o hábito de consumo de embutidos, e entre esses produtos destaca-se o salame tipo italiano.

O salame tipo italiano possui um sabor típico característico, resultado do equilíbrio entre compostos voláteis (álcool, cetonas, aldeídos e furanos) e não-voláteis (aminoácidos, peptídeos, açúcares e nucleotídeos), provenientes das matérias-primas utilizadas (carnes, especiarias, nitritos e outros aditivos) ou gerados a partir de reações bioquímicas que ocorrem durante a fermentação e maturação (FLORES et al., 1997; TOLDRÁ, 1998; STAHNKE, 2002). Os componentes não voláteis, como peptídeos e aminoácidos, fornecem gostos básicos, como doce, salgado, azedo e amargo, sendo que estes compostos são produzidos durante a hidrólise das proteínas da carne, e sua presença determina, na maioria das vezes, as características sensoriais do produto final (MATTHEW et al., 1996).

Esse produto possui um alto valor agregado, e constitui uma importante fonte de sódio, podendo atingir valores acima de 5,0% (CICHOSKI et al., 2009). Dentre as alternativas viáveis para redução de cloreto de sódio (NaCl) tem-se a substituição parcial por outros sais de cloreto (KCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$). Porém estes substitutos apresentam restrições, uma vez que podem influenciar na qualidade sensorial dos produtos e sua aplicação fica restrita a um valor limite e a adaptação do consumidor à nova intensidade no sabor e aroma provocada por essa alteração (IBÁÑEZ et al., 1996; GUARDIA, et al. 2006). Em produtos cárneos fermentados, a redução do NaCl e formulação com diferentes combinações de sais de cloretos tem demonstrado níveis tecnológicos e microbiológicos satisfatórios de redução em torno de 50 a 60% de NaCl, mas com efeito negativo na qualidade do salame (CAMPAGNOL et al., 2012; SANTOS et al., 2014; ALMEIDA et al., 2015), decorrente da alteração da atividade enzimática (ZAO, 2005) causada pela redução do NaCl e a adição dos cloretos substitutos, sendo necessário, muitas vezes, a adição de substâncias para melhorar a qualidade do salame.

O NaCl além de realçar o sabor, dos alimentos, inibir o crescimento microbiano e a atividade enzimática (ANDRES, et al., 2007) também contribui para a oxidação lipídica (ORDONEZ et al., 1999). Sendo assim a diminuição da adição de NaCl no salame terá múltiplos efeitos e muito provavelmente irá provocar alterações na cinética da oxidação lipídica, na ação das peptidases e aminopeptidases, ou seja nas proteínas e peptídeos respectivamente, bem como na composição dos compostos orgânicos voláteis (VOC) e não voláteis produzidos.

A microextração em fase sólida com a cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (SPME-HRGC/MS) se não é a melhor é uma das melhores ferramentas a ser utilizada para analisar os VOC produzidos no salame (ROSS; SMITH, 2005). Está técnica possibilita identificar, com grande precisão, a presença de VOC originários, intermediários e finais das reações de degradação que impactam a qualidade do salame, como a lipólise e a degradação de Strecker (Del PULGAR et al., 2013). O principal produto da oxidação lipídica é o hexanal, um VOC, considerado indicador da degradação dos lipídeos (ROSS; SMITH, 2005). O 3-metilbutanal e 2-metilbutanal são sub-produtos da degradação de Strecker na qual um aminoácido reage com um epoxialqueno. Desta forma o monitoramento destes aldeídos é de fundamental importância para se entender algum dos mecanismos que estão por trás da qualidade do salame.

Sendo assim este trabalho teve por objetivo utilizar uma nova abordagem relacionando a lipólise com a degradação de Strecker em um ambiente de produção de salames com baixo teor de NaCl, observando os seus efeitos na proteólise e na resposta sensorial dos consumidores, empregando SPME/HRGC-MS para analisar os voláteis, mais especificamente os aldeídos hexanal, 2,4 decadienal, 3-metilbutanal e 2-metilbutanal, para assim selecionar a mistura de cloretos substitutos que apresente a resposta sensorial mais próxima ao salame comercial e verificar a existência de uma possível relação entre a análise sensorial e a análise dos voláteis e desta maneira entender o porque, a ciência por trás, da preferência do consumidor por uma formulação em especial.

3.2 Material e Métodos

Os salames foram preparados com cinco níveis de substituição de cloreto de sódio (NaCl) por cloreto de potássio (KCl) misturado com cloreto de cálcio (CaCl_2). Amostras de salame controle foi preparado com níveis normais de 25g kg^{-1} NaCl (SC 2,5) e outras amostras de salame controle com a adição de 10g kg^{-1} de NaCl (SC 1,0) sem substitutos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Níveis de substitutos de sal e a redução de NaCl nos diferentes tratamentos

Tratamentos	Quantidade de sais adicionados em g kg^{-1} (m/m%)		
	Cloreto de sódio (NaCl)	Cloreto de Potássio (KCl)	Cloreto de Cálcio (CaCl_2)
SL0,45/0,45	10,0 (1,0)	4,5 (0,45)	4,5 (0,45)
SL0,40/0,40	10,0 (1,0)	4,0 (0,40)	4,0 (0,40)
SL0,35/0,35	10,0 (1,0)	3,5 (0,35)	3,5 (0,35)
SL0,25/0,25	10,0 (1,0)	2,5 (0,25)	2,5 (0,25)
SC1,0	10,0 (1,0)	0,0	0,0
SC2,5	25,0 (2,5)	0,0	0,0

SC-salame controle;

SL-salame com baixo teor de sódio e cloretos substitutos

3.2.1 Processo de produção

As matérias-primas utilizadas neste experimento foram adquiridas em um matadouro sob inspeção federal (Frigorífico Angelelli, Piracicaba, Brasil). A produção foi realizada no Laboratório de Qualidade da Carne e Processamento da ESALQ, Universidade de São Paulo (USP). O salame italiano foi preparado com paleta suína (600g kg^{-1}), dianteiro bovino (250g kg^{-1}) e toucinho da região custo lombar de suínos (150g kg^{-1}). Carne bovina e suína refrigerada foram previamente pesadas e cortadas e moídas separadamente usando um moedor (HOBART 4B22-2) com discos de aço inoxidável com 10, 5 e 8 mm para carne suína, carne bovina e toucinho, respectivamente. Inicialmente, foi adicionado carne suína e carne bovina, seguido de toucinho. Após a mistura da carne crua, ingredientes não cárneos foram adicionados NaCl e misturas de KCl e CaCl_2 , de acordo com cada tratamento (Tabela 3.1).

Além disso, os seguintes ingredientes comuns foram adicionados à mistura de carne em cada tratamento: nitrito de sódio ($0,15\text{g kg}^{-1}$) e nitrato de sódio ($0,15\text{g kg}^{-1}$), eritorbato de sódio ($3,0\text{g kg}^{-1}$), condimentos ($7,0\text{g kg}^{-1}$), de dextrose ($0,70\text{g kg}^{-1}$), cultura "starter" comercial ($0,25\text{g kg}^{-1}$; Bactoferm t-SPX Chr.Hansen) contendo *Pedococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*. A

massa de carne foi embutida em tripa de colágeno reconstituídos medindo 45 mm de diâmetro. Os salames foram padronizados em 400 g cada, pendurados em hastes de metal e colocadas em câmara de fermentação a 23 ± 1 °C durante 48 h, com umidade relativa entre 85-90% até atingir um pH entre 4.9-5.2. Mais tarde, os salames foram levados para uma câmara de maturação a 16-18 °C e umidade relativa entre 65-75%. Os salames permaneceram nesta câmara por 26 dias até atividade de água estar entre 0.88-0.92 para todos os tratamentos. Em seguida, os invólucros foram removidos e os salames foram embalados sob vácuo e congeladas a $-25^{\circ}\text{C} \pm 1$ °C até o momento da análise.

3.2.2 Delineamento experimental

Para coleta dos dados físico-químicos, utilizou-se um delineamento em blocos completos, considerando cada processamento como um bloco ($N = 2$). Cada tratamento foi processado em replicata, sendo divididos em: SL0,45/0,45 – 10g kg^{-1} NaCl + $4,5\text{g kg}^{-1}$ KCl + $4,5\text{g kg}^{-1}$ CaCl₂; SL0,40/0,40 – 10g kg^{-1} NaCl + 4g kg^{-1} KCl + 4g kg^{-1} CaCl₂; SL0,35/0,35 – 10g kg^{-1} NaCl + $3,5\text{g kg}^{-1}$ KCl + $3,5\text{g kg}^{-1}$ CaCl₂; SL0,25/0,25 – 10g kg^{-1} NaCl + $2,5\text{g kg}^{-1}$ KCl + $2,5\text{g kg}^{-1}$ CaCl₂; SC1,0 – 0g kg^{-1} NaCl; SC2,5 – 25g kg^{-1} NaCl. Amostras de salames crus (massa de salame) e de salames maturados foram submetidos a análises físico-químicas de pH e atividade de água. Para a análise do teor de Na, as amostras foram retiradas após o termino da maturação dos salames (28 dias). Para gerar dados sensoriais, um delineamento experimental quadrado latino foi utilizado, considerando efeitos de ordem de apresentação das amostras.

3.2.3 Análises físico-químicas

As medições de pH foram realizadas utilizando-se um pHmetro da Oakton pH300, calibrado com solução tampão de pH 4,0 e 7,0. Foram realizadas nos tempos 0 horas, após a fermentação, final da secagem (14 dias) e do processamento dos salames (28 dias), com 3 medições em cada salame (3 salames/tratamento), escolhidas aleatoriamente.

3.2.4 Determinação da Atividade de Água

A atividade de água foi determinada por medida direta utilizando-se o analisador Aqualab 4TE (marca Decagon Devices Inc.) operando-se na temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$. Para a análise, fatias de aproximadamente 3 mm de espessura, sem as bordas, foram dispostas em cápsulas próprias para a análise, com exceção da massa que foi distribuída no fundo da cápsula com o auxílio de uma espátula. As determinações de atividade de água foram realizadas nos tempos 0 horas, após a fermentação, final da secagem

3.2.5 Determinação de Sódio

Para verificar o teor de sódio no salame, foi realizada análise conforme a metodologia da AOAC (2005). Pesou-se de 5 a 10g de amostra diretamente na cápsula de porcelana, previamente aquecidos em mufla a 550°C , resfriados e pesados, anotando os pesos. A cápsula com a amostra foi carbonizada em chapa elétrica e depois calcinado em mufla à temperatura de 550°C e transformada em cinza de acordo com metodologia descrita 31.1.04 da AOAC (1995). Com as cápsulas frias, as cinzas foram dissolvidas com 2,5 mL de ácido nítrico P.A. e transferidas para um balão volumétrico de 50 mL. Foi feita uma amostra em branco como controle e a leitura realizada em um fotômetro de chama.

3.2.6 Análise dos compostos voláteis

Extração dos compostos voláteis por SPME

Os aldeídos foram extraídos do *headspace* dos salames com a técnica de microextração em fase sólida (SPME) utilizando um *holder* Supelco (Bellefonte, PA, USA) e uma fibra de Carboxen/Polidimetilsiloxano de 85 μm StableFlex (CAR/PDMS). Num vial de 20 mL, tampa com septo de silicone/teflon, foram pesados 10 g de salame moído. O vial foi fechado e mantido a 30°C em banho maria, por 1 h, para equilibrar a temperatura. Depois a fibra CAR/PDMS foi inserida no *headspace* do vial e mantida por 1 h, para adsorção dos compostos voláteis, com todo o conjunto em banho-maria a 30°C .

Separação, identificação e quantificação dos compostos voláteis porHRGC/MS

A separação, identificação e quantificação dos aldeídos foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu modelo GCMS-QP2010 Plus (Japão), equipado com um injetor split/splitless. Os compostos adsorvidos na fibra de CAR/PDMS foram dessorvidos no injetor do cromatógrafo a gás por 20 min a 280°C no modo split. Os compostos foram separados utilizando uma coluna capilar de sílica fundida RTX-5 MS, Restek US (Bellefonte, PA, USA), (30 m, 0.25 mm diâmetro interno, e 0.25 µm de espessura de filme). O programa de temperatura do forno do cromatógrafo foi 40°C por 1 minuto, seguindo até 250°C a uma taxa de aquecimento de 5°C/min, então a 250°C constante por 1 min. A razão do split foi 1:25, o fluxo de gás 1 mL/min, a velocidade linear de 36 cm/s, tendo como gás de arraste hélio ultra puro. Os espectros de massas foram obtidos entre m/z 40 e 450 u.m.a. para cada composto. O espectrometro de massas foi operado no modo SCAN, e a ionização foi por impacto de elétrons, com 70 eV de energia de ionização. A linha de transferência e a fonte de íons foram mantidas a 250°C. A identificação do hexanal foi por comparação com o tempo de retenção de solução padrão, os demais aldeídos foi por comparação com os espectros de massas das bibliotecas WILEY 8 Ed., FFNSC 1.3, e pelo índice de retenção de Kovats. A quantificação foi baseada no cromatograma do ion total (TIC) e os resultados foram expressos em unidades de área (UA) x 10⁵/g (base úmida), sendo a média de duas replicatas.

3.2.7 Análise do consumidor

Um total de 52 indivíduos com idades variando entre 21 e 60 anos recrutados nas imediações da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), em Piracicaba. Esses foram colocados em cabines sensoriais individuais do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN-ESALQ/USP) implementadas com luz branca, circulação de ar e controle de temperatura. Antes do início do teste, receberam as instruções do uso da escala e do tipo de avaliação sensorial que iriam realizar. As sete amostras de salames foram servidas de

forma monódica de acordo com a ordem de apresentação seguindo um delineamento experimental quadrado latino onde controla-se a ordem de apresentação e a sequência de provadores, com um intervalo entre a 4 e a 5 amostra para evitar a fadiga sensorial.

Assim, os consumidores foram convidados a provar o produto e avaliar o quanto eles gostaram ou não cada amostra em termos de textura, sabor e aceitação global, utilizando uma escala hedônica de nove pontos (1 = não gostei muito, 5 = Nem gostei nem desgostei, 9 = gostei muitíssimo) (MEILGAARD et al., 2007). Depois disso, os consumidores avaliaram o teor de sal das amostras por meio de uma escala -Just About Right (JAR) (7 = muito alto, 4 = ideal e 1 = muito baixo) (POPPER, 2014). Finalmente, os consumidores avaliaram sua intenção de compra para os produtos testados por meio de uma escala estruturada de cinco pontos (1 = certamente não compraria, 3 = posso ou não comprar e 5 = certamente compraria). Este estudo foi registrado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ESALQ / USP sob o protocolo nº 104/2012.

3.3 Resultados e Discussão

Com relação às análises físico-químicas realizadas e descritas na Tabela 3.2, observou-se que a fermentação dos salames em todas as combinações de sais utilizadas foi adequada, conseguindo reduzir o pH a níveis entre 5,2 - 5,0 após 48 horas de fermentação, retornando a 5,3 após a maturação. Estes valores foram observados em todos os tratamentos e são considerados típicos da maturação do salame tipo italiano, devido à formação de compostos básicos de nitrogênio não protéico (NPN), além do efeito tampão da proteína (ASTIASARÁN et al., 1990).

Assim, pode-se verificar que os substitutos KCl e CaCl₂ nas combinações propostas não afetaram o desenvolvimento da cultura starter comercial (*Pedococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*). Essa cultura starter comercial é indicada para produtos com adição de 2,5% de cloreto de sódio, além disso, pode-se supor que a adição dos carboidratos (dextrose e sacarose) utilizados foram suficientes para a acidificação do salame.

Tabela 3.2-Média ($\pm$ Desvio padrão) das análises físico químicas dos tratamentos em estudo

Tratamentos	Análises físico químicas		
	pH final	Aw final	Na (mg/100 g)
SC1,0	5,3 ^a $\pm$ 0,05	0,91 ^b $\pm$ 0,01	880 $\pm$ 17,51
SL0,25/0,25	5,2 ^a $\pm$ 0,06	0,91 ^b $\pm$ 0,01	968 $\pm$ 1,72
SL0,35/0,35	5,2 ^a $\pm$ 0,10	0,91 ^b $\pm$ 0,01	910 $\pm$ 13,67
SL0,40/0,40	5,2 ^a $\pm$ 0,06	0,91 ^b $\pm$ 0,01	870 $\pm$ 14,01
SL0,45/0,45	5,1 ^a $\pm$ 0,01	0,91 ^b $\pm$ 0,01	834 $\pm$ 35,19
SC2,5	5,2 ^a $\pm$ 0,02	0,90 ^a $\pm$ 0,01	2442 $\pm$ 14,10
SC-salame controle; SL-salame com baixo teor de sódio e cloretos substitutos; SL0,45/0,45 – 10g kg ⁻¹ NaCl + 4,5g kg ⁻¹ KCl + 4,5g kg ⁻¹ CaCl ₂ ; SL0,40/0,40 – 10g kg ⁻¹ NaCl + 4 g kg ⁻¹ KCl + 4g kg ⁻¹ CaCl ₂ ; SL0,35/0,35 – 10g kg ⁻¹ NaCl + 3,5g kg ⁻¹ KCl + 3,5g kg ⁻¹ CaCl ₂ ; SL0,25/0,25 – 10g kg ⁻¹ NaCl + 2,5g kg ⁻¹ KCl + 2,5g kg ⁻¹ CaCl ₂ ; SC1,0 – 10g kg ⁻¹ NaCl; SC2,5 – 25g kg ⁻¹ NaCl,			

Esses resultados corroboram com o descrito na literatura (VURAL, 1998; CIROLINI et al., 2010), devido ao fato da acidificação dos salames dependerem do tipo de cultura starter utilizada e junto a uma adequada combinação de carboidratos de modo a reduzir o tempo de fermentação. Os micro-organismos usados atualmente para a produção de salames são as bactérias lácticas homofermentativas para a produção de ácido e os *Staphylococcus* coagulase negativa para a estabilidade da cor, prevenção de oxidação lipídica e produção de aromas (DROSINOSET et al., 2005).

A baixa Aw na produção de salames funciona como uma das principais barreiras contra os micro-organismos. Todos os tratamentos apresentaram valores de atividade de água aceitáveis (0,90), já que a Instrução Normativa nº22, de 31 de Julho de 2000 define que este deve apresentar no máximo 0,92 (BRASIL, 2000).

Com relação ao teor de sódio, a substituição de NaCl por diferentes misturas de cloreto (KCl + CaCl₂), resultou em uma redução de aproximadamente 63% no teor de Na. Os tratamentos SL0,25/0,25, SL0,35/0,35, SL0,40/0,40, SL0,45/0,45 e SC1,0, apresentaram teores de Na entre 865-898 mg/100g enquanto o tratamento SC2,5 (controle com valor próximo ao comercial) obteve 2452 mg/100g. No mercado brasileiro, o salame tipo italiano encontram-se com teores de Na entre 1612 mg Na/100g a 2562 mg Na/100g. Portanto, a comercialização de um produto com baixo teor de sódio é uma boa opção para a indústria e os consumidores. No entanto, uma

redução de sal, a este nível é considerado crítico por causa da contaminação microbiana ou risco da heterofermentação durante o processo de fermentação do salame (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005).

Pode-se observar, na Figura 3.1, que o controle alto (SC2,5), foi de todos tratamentos o que obteve as melhores notas na análise sensorial. Esse resultado era esperado pois a quantidade de sal está de acordo com o padrão comercial consumido pelos provadores, ou seja 2,5% de NaCl.

Figura 3.1 - Médias dos atributos Aceitação Global e Sabor dos salames em estudo

O tratamento SC2,5 também teve como característica o maior valor da concentração de hexanal e menor valor na concentração de 3-metilbutanal e 2-metilbutanal, entre todos tratamentos (Tabela 3.3). Por ter a maior concentração de NaCl, o qual é pró-oxidante (ORDONEZ et al., 1999), este tratamento foi submetido a uma maior ação da enzima lipoxidase (LAWRIE, 2006), ou seja houve uma maior oxidação lipídica e maior concentração de hexanal, consequentemente.

Tabela 3.3 - Concentração de aldeídos, em unidades de área (UA) x 10⁵/g, relacionados com lipólise e a degradação de Strecker detectados no headspace do salame

Aldeídos	Tratamentos					
	SC2,5	SC1,0	SL0,25/0,25	SL0,35/0,35	SL0,4/0,4	SL0,45/0,45
Hexanal	70,55	22,31	51,44	9,43	8,49	3,08
2,4 decadienal	0,75	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3-metilbutanal	0,39	0,89	0,57	0,93	2,57	2,26
2- metilbutanal	0,0	0,39	0,13	0,37	1,08	1,02
Hexanal/3metilbutanal	180,9	25,10	90,20	10,10	3,30	1,40

SC-salame controle; SL-salame com baixo teor de sódio e cloretos substitutos; SL0,45/0,45 – 10g kg⁻¹ NaCl + 4,5g kg⁻¹ KCl + 4,5g kg⁻¹ CaCl₂; SL0,40/0,40 – 10g kg⁻¹ NaCl + 4 g kg⁻¹ KCl + 4g kg⁻¹ CaCl₂; SL0,35/0,35 – 10g kg⁻¹ NaCl + 3,5g kg⁻¹ KCl + 3,5g kg⁻¹ CaCl₂; SL0,25/0,25 – 10g kg⁻¹ NaCl + 2,5g kg⁻¹ KCl + 2,5g kg⁻¹ CaCl₂; SC1,0 – 10g kg⁻¹ NaCl; SC2,5 – 25g kg⁻¹ NaCl,

De forma resumida pode-se dizer que as principais etapas que ocorrem na degradação lipídica em sequência são: (A) quebra dos lipídeos em ácidos graxos livres, sendo os triglicerídeos pela ação das lipases e os fosfolipídeos pela ação das fosfolipases (TOLDRA, 1998). (B) Oxidação dos ácidos graxos livres em peróxidos e (C) outras reações que convertem os peróxidos em compostos voláteis de aroma (TOLDRA, 1998).

Porém, com relação a ação das aminopeptidases, o NaCl apresenta um efeito inibitório (TOLDRA, 1998). Muito provavelmente essa concentração mais elevada do NaCl no tratamento SC2,5 favoreceu uma maior redução na atividade dessas enzimas que teve como consequência uma menor produção de aminoácidos. Essa menor produção de aminoácidos pode ser admitida devido a menor concentração do sub-produto da reação de degradação de Strecker, o 3-metilbutanal, o qual é resultado da reação de um epoxialqueno, originário da oxidação de 2,4 decadienal, com a leucina, a qual é um dos produtos da ação das aminopeptidases nos peptídeos (Dei PULGAR, 2013). Então se a concentração relativa de 3-metilbutanal é menor pode-se admitir que, no tratamento SC2,5, houve uma menor produção deste aldeído e perda de leucina em relação aos outros tratamentos.

O tratamento SC1,0, com 1% de NaCl, apresentou concentração de hexanal três vezes menor e valor de 3-metilbutanal duas vezes maior que o tratamento SC2,5, que tem 2,5% de NaCl. Isso muito provavelmente se deve a menor concentração de NaCl, que acarreta em menor oxidação lipídica e como consequência menor formação de hexanal e menor inibição à ação das aminopeptidases que possibilita uma maior formação de

aminoácidos. Neste tratamento além de 3-metilbutanal também houve formação de 2-metilbutanal, que é sub-produto da degradação da isoleucina (WU et al., 2015).

Da mesma forma pode ser admitido que uma maior concentração de aminoácidos acarreta numa maior disponibilidade de reagente para a reação de degradação de Strecker, e assim maior produção de 3-metilbutanal e 2-metilbutanal com maior perda relativa de aminoácidos quando comparado ao tratamento SC2,5.

Os tratamentos de SL0,25/0,25 a SL0,45/0,45 apresentam todos 1% de NaCl e valores crescentes da mistura de KCl + CaCl₂, como pode ser visto na Tabela 3.1.

O KCl é descrito na literatura como sendo um sal que reduz o fenômeno da oxidação (ORDONEZ, 1999). Essa característica pode ser constatada pela observação da Tabela 3, onde com o aumento da concentração da mistura de KCl + CaCl₂, nos tratamentos, ocorre a correspondente redução da concentração de hexanal, ou seja uma menor oxidação lipídica. Essa mistura, na faixa deste trabalho, inibe a ação da enzima lipoxidase, além de favorecer a atividade relativa das aminopeptidases com o aumento da concentração dos cloretos substitutos, ou seja, maior produção de 3-metilbutanal e 2-metilbutanal e a correspondente perda de aminoácidos. De acordo com Armenteiros et al. (2009) as enzimas arginina e leucina aminopeptidase são mais ativadas pelo KCl e por outro lado Metionina aminopeptidase e dipeptidil peptidase I e III são mais inibidas com o aumento da concentração de KCl.

O tratamento que obteve médias de aceitação sensorial mais próxima a formulação semelhante a comercial (controle alto [SC2,5]) foi o tratamento SL0,25/0,25, que apresentou a menor concentração de 3-metilbutanal e 2-metilbutanal, ou seja a menor perda relativa de leucina e isoleucina, maior concentração de hexanal e menor quantidade de cloretos substitutos entre os 4 tratamentos com variação de cloretos substitutos. Pode-se admitir que o tratamento SL0,25/0,25 apresentou, depois do tratamento SC2,5, provavelmente a menor perda relativa de aminoácidos e peptídeos relacionados a sabor, ou seja, o monitoramento indireto das perdas de

aminoácidos e peptídeos, através da análise dos VOC, pode ser uma abordagem eficaz para a escolha da melhor formulação de salame.

A relação das unidades de área (UA) de hexanal/3-metilbutanal [Hex/3-met] (Tabela 3.3) é descrita por del PULGAR, (2013) como um indicativo do balanço entre as reações de oxidação lipídica e a degradação de aminoácidos em carnes e produtos de carnes. Acreditamos que essa relação também pode ser utilizada como um parâmetro de escolha, no qual o valor de Hex/3-met do produto a ser formulado seja o mais próximo do produto controle, ou seja, a formulação que tenha a menor perda de aminoácidos.

3.4 Conclusão

Neste trabalho o perfil dos VOC de salame com baixos teores de sódio foi estudado por SPME/HRGC-MS. Essa abordagem possibilitou o estudo dos efeitos da redução do NaCl e adição de cloretos substitutos no salame sobre a lipólise, proteólise e degradação de Strecker. Pode-se concluir da existência de uma relação entre a concentração de aldeídos e as médias de aceitação sensorial. Essa relação, nas condições deste trabalho, poderá ser utilizada para orientar a escolha da concentração dos cloretos substitutos que minimiza os efeitos adversos da redução do NaCl sobre a qualidade sensorial do salame.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Projeto 2012/07113-2. Gostaríamos de agradecer também a Christian Hansen, IBRAC e Cryovac que forneceram as culturas iniciadoras, aditivos e embalagens, respectivamente.

Referências

ALMEIDA, M.A.; VILLANUEVA, N.D.M.; RIBEIRO, F.A.; FADDA, S.G.; PINTO, J.S.S.; CONTRERAS CASTILLO, C.J. Sensory acceptability of partial replacement of sodium chloride by potassium chloride and calcium chloride in production of salami with low sodium. **Meat Science**, Barking, v. 101, p.104-105, 2015.

ANDRÉS, A.; BARAT, J.M.; GRAU, R.; FITO, P. Principles of drying and smoking. In: TOLDRÁ, F. (Ed.). **Handbook of fermented meat and poultry**. Ames: Blackwell, 2007. chap. 3, p. 37-48.

ASTIASARAN, I.; VILLANUEVA, R.; BELLO, J. Analysis of proteolysis and protein Insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage. **Meat Science**, Barking, v. 28, p.111-117, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade de Qualidade de Salames. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 ago. 2000. p. 15-28.

CAMPAGNOL, P.C.B.; SANTOS, B.A.dos; TERRA, N.N.; POLLONIO, M.A.R. Lysine, disodium guanylate and disodium inosinate as flavor enhancers in low-sodium fermented sausages. **Meat Science**, Barking, v. 91, p. 334-338, 2012.

CICHOSKI, A.J.; ZIS, L.C.; FRANCESCHETTO, C. Características físico-químicas e microbiológicas da superfície do salame tipo italiano contendo solução de lactato de potássio. **Food Science and Technology**. Campinas, v. 29, n. 3, p. 546-552, 2009.

CIROLINI, A.; FRIES, L.L.M.; TERRA, N.N.; MILANI, L.I.G.; URNAU, D.; SANTOS, B.A. dos; CERVO, G.D.; REZER, A.P.S. Fermented italian sausage elaborated with native starter cultures. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 171-179, 2010.

DROSINOS, E.H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N.; MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, Barking, v. 69, n. 2, p. 307-317, 2005.

FLORES, J.; MARCUS, J.R.; NIETO, P.; NAVARRO, J.L. Effect of processing conditions on proteolysis and taste of dry-cured sausages. **Zetischrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A**, Berlim, v. 204, p. 168-172, 1997.

GUARDIÁ, M.D.; GUERRERO, L.; GELABERT, J.; GOU, P.; ARNAU, J. Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. **Meat Science**, Barking, v. 73, n. 3, p. 484-490, 2006.

HERRANZ, B.; DE LA HOZ, L.; HIERRO, E.; FERNÁNDEZ, M.; ORDÓNEZ, J.A. Improvement of the sensory properties of dry-fermented sausages by the addition of free amino acids. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 673-682, 2005.

IBAÑEZ, C.; QUINTANILLA, L.; CID, C.; ASTIASARÁN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum*-*Staphylococcus carnosus* part I: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the stability and the nitrosation process. **Meat Science**, Barking, v. 44, p. 227–235, 1996.

LAWRIE, R.A. **Meat science**. 7th ed. Cambridge: Woodhead Publ., 2006. 464p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 464 p.

MENTE, A.; O'DONNELL, M.J.; RANGARAJAN, S.; MCQUEEN, M.J.; POIRIER, P.; WIELGOSZ, A.; MORRISON, H.; LI, W.; WANG, X.; DI, C.; MONY, P.; DEVANATH, A.; ROSENGREN, A.; OGUZ, A.; ZATONSKA, K.; YUSUFALI, A. H.; LOPEZ-JARAMILLO, P.; AVEZUM, A.; ISMAIL, N.; LANAS, F.; PUOANE, T.; DIAZ, R.; KELISHADI, R.; IQBAL, R.; YUSUF, R.; CHIFAMBA, J.; PHIL, M.; KHATIB, R.; TEO, K.; YUSUF, S.; SALIM, D. P. Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 371, p. 601-611. 2014.

ORDÓÑEZ, J.A.; HIERRO, E.M.; BRUNA, J.M.; De La HOZ, L. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 39, n. 4, p. 329-367, 1999.

POPPER, R. Use of just-about-right in consumer research. In: VARELA, P.; ARES, G. Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling. Boca Raton: CRC Press, 2014. p. 137-156.

ROSS, C.F.; SMITH, D.M. Use of volatiles as indicators of lipid oxidation. **Muscle Foods**, Trumbull, v.4, p. 18-25, 2005.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**, Barking, v. 70, n. 3, p. 531-541, 2005.

SANTOS, B.A. dos; CAMPAGNOL, P.C.B.; MORGANO, M.A.; POLLONIO, M.A.R. Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine and taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with 50% and 75% replacement of NaCl with KCl. **Meat Science**, Barking, v. 96, p.509-513, 2014.

STAHNKE, L. Flavour formation in fermented sausage. In: TOLDRÁ, F. (Ed.). **Research advances in the quality of meat and meat products**. Kerala: Research Signpost. 2002. p. 193-223.

TOLDRÁ, F. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. **Meat Science**, Barking, v. 49, n. 1, p. 101-110, 1998.

VURAL, H. The use of commercial starter cultures in the production of Turkish semi-dry fermented sausages. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A**, Berlin, v. 207, p. 410–412, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline:** sodium intake for adults and children. Geneva, 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77985/1/9789241504836_eng.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2015.

WU, H.; ZHUANG, H.; ZHANG, Y.; TANG, J.; YU, X.; LONG, M.; WANG, J.; ZHANG, J. Influence of partial replacement of NaCl with KCl on profiles of volatile compounds in dry-cured bacon during processing. **Food Chemistry**, London, v. 172, p. 391–399, 2015.

ZHAO, G.M.; ZHOU, G.H.; TIAN, W.; XU, X.L.; WANG, Y.L.; LUO, X. Changes of alanyl aminopeptidase activity and free amino acid contents in biceps femoris during processing of Jinhua ham. **Meat Science**, Barking, v.71, p. 612–619, 2005.

Anexo -Compostos orgânicos voláteis (unidades de área (UA) x 10⁵/g) detectados no headspace do salame com 28 dias (continua)

	IKc	IKt	SL 0.45/ 0.45	SL 0.4/ 0.4	SL 0.35 /0.35	SL 0.25/ 0.25	SC 1.0	SC 2.5
Pentano	500	C	--	--	--	6,64	3,48	11,41
Dissulfeto de carbono	538	C	0,83	1,32	1,71	0,97	1,20	0,40
2-Propeno 1 tiol	599	C	24,10	35,35	27,12	--	15,52	--
Sulfeto de propileno	600	B	--	--	--	12,2	--	--
Ácido Acético	615	C	4,42	10,50	8,16	8,20	12,27	--
3-Metilbutanal	651	B	2,26	2,57	0,93	0,57	0,89	0,39
2-Metilbutanal	662	B	1,02	1,08	0,37	0,13	0,39	--
3 Hidroxi penteno	683	B	--	--	--	0,14	0,05	0,34
2,3 Epoxihexanol	689	C	--	--	--	--	--	1,05
4-Pentalenal	690	C	--	--	--	0,24	--	--
Pentalenal	700	B	--	--	--	18,1	--	19,55
3 Metil tio 1 Propeno	700	C	14,12	22,70	14,19	--	13,53	--
3 Hidroxi 2 butanona	710	B	4,96	7,74	5,99	2,52	3,57	2,92
Monovinil ester de etilenoglicol	722	C	--	--	--	0,04	--	--
Álcool Isopentílico	734	B	--	--	--	0,33	0,56	--
2-Pentalenal {2E}	756	B	--	--	--	0,26	--	0,92
Álcool Pentílico	766	B	--	--	--	2,39	1,24	5,83
Ácido Butanóico	789	C	--	0,60	0,22	--	0,50	--
Ácido Heptanóico	790	C	--	--	--	0,37	--	--
1 Octeno	791	C	--	--	--	--	--	0,74
Hexanal	802	A	3,08	8,49	9,43	51,4	22,31	70,55
Ácido Isovalérico	844	B	--	0,11	0,09	--	0,16	0,11
2-Hexanal	854	B	--	--	--	0,28	--	1,56
Dialil Sulfeto	858	B	4,05	8,31	4,03	1,63	4,10	0,82
1-Hexanol	870	B	--	1,08	0,22	0,66	1,08	2,88
2-Heptanona	893	B	--	--	--	0,24	--	1,42
6-Metil 1-Heptanol	900	C	--	--	--	0,06	--	--
Heptanal	903	B	0,25	0,50	0,55	4,28	1,34	10,28
Óxido de Hepteno	907	C	--	--	--	0,08	--	--
2 Hexil Oxirano	907	C	--	--	--	--	--	1,54
Propanal	909	B	--	0,48	--	--	0,24	--
3-Metil tio propanal	910	C	0,37	--	--	0,10	--	--
Dissulfeto de 2 metil propenil	918	C	--	--	--	1,41	3,22	1,29
α Thujeno	928	B	9,73	9,41	9,14	6,34	9,17	5,02

Anexo -Compostos orgânicos voláteis (unidades de área (UA) x 10⁵/g) detectados no headspace do salame com 28 dias (continuação)

	IKc	IKt	SL 0.45/ 0.45	SL 0.4/ 0.4	SL 0.35 /0.35	SL 0.25/ 0.25	SC 1.0	SC 2.5
α Pineno	935	B	9,61	8,08	8,79	5,97	6,19	3,83
Canfeno	950	B	0,25	0,19	0,20	0,16	0,13	
2-Heptenal {2E}	958	B	--	--	--	1,83	0,34	7,53
Benzaldeído	964	B	1,33	1,56	0,39	0,65	0,96	2,94
1-Heptanol	972	B	--	--	--	0,06	--	0,90
Sabineno	975	B	20,55	20,22	19,92	14,8	20,25	12,54
β Pineno	979	B	15,96	14,49	15,24	12,2	11,41	13,92
2-Metil 3-Octanona	985	C	--	--	--	0,57	0,54	1,35
Ácido Cáprico	989	C	--	--	--	--	--	1,35
Mirceno	992	B	7,54	8,15	5,76	4,18	0,86	--
Decano	1000	B	--	--	--	0,11	0,07	--
Octanal	1004	B	--	--	--	2,08	0,93	7,87
α Felandreno	1006	B	18,95	1,84	1,47	--	1,70	--
δ 3-Careno	1012	B	1,56	1,22	0,82	1,10	1,54	1,79
α Terpineno	1019	B	2,54	2,18	2,06	1,13	2,31	0,87
p Cimenol	1027	B	5,40	5,41	4,53	3,11	5,77	3,87
Limoneno	1031	C	43,44	43,75	41,44	32,3	53,14	33,51
3 Etil 2metil 1,3 Hexadieno	1035	B	--	--	--	--	--	3,43
2-Ciclopentil ciclopentanol	1035	C	--	--	--	0,82	--	--
3,5 Octadieno 2-ol	1040	B	--	--	--	--	--	0,08
Fenilacetaldéido	1047	B	--	--	--	--	0,51	--
2,2,3,4 Tetrametil Pentano	1054	C	--	--	0,08	--	--	--
3-metil nonano	1054	B	--	--	--	0,15	--	--
2 Octenal	1060	B	--	--	--	--	--	7,64
γ Terpineno	1061	C	3,42	2,84	2,91	2,78	3,26	--
2 metil 1 octanol	1067	C	--	--	--	0,06	--	--
Hidrato cis Sabineno	1070	B	0,26	0,33	--	0,20	--	0,45
4 Thujanol	1070	B	--	--	0,19	--	0,34	--
2 Propil 1 Hepatanol	1073	B	--	--	--	0,06	--	--
3,3 Dimetil Octano	1076	B	--	--	0,23	--	--	--
2,3,4 trimetil decano	1076	B	0,36	--	--	0,44	--	--
Dissulfeto de 2-propenila	1082	B	5,43	9,47	--	3,61	9,62	4,85
α Terpinoleno	1091	B	1,27	0,98	1,17	0,48	1,53	0,24
3 Metil 1,6 Heptadieno 3 ol	1096	B	--	--	--	--	--	0,36
Hidrato de Sabineno trans	1101	C	--	--	--	--	0,48	--

Anexo -Compostos orgânicos voláteis (unidades de área (UA) x 10⁵/g) detectados no headspace c
salame com 28 dias (conclusão

	IKc	IKt	SL 0.45/ 0.45	SL 0.4/ 0.4	SL 0.35 /0.35	SL 0.25/ 0.25	SC 1.0	SC 2.5
Linalol	1002	B	0,35	0,43	--	--	--	0,33
Nonanal	1106	B	0,39	0,63	0,34	1,68	1,36	5,77
2,2,5,5 Tetrametil Hexano	1124	C	--	0,12	0,05	--	0,08	--
2 Nonenal {E}	1163	B	--	--	--	0,21	--	2,03
1,1 Oxi-bis-octano	1165	C	--	--	--	0,11	--	--
Terpinen 4-ol	1182	B	1,53	2,02	1,18	1,22	2,18	1,76
α Terpineol	1196	C	--	--	--	0,08	0,14	--
Decanal	1208	B	--	--	--	--	--	0,10
2,4 Nonadienal {2E,4E}	1218	B	--	--	--	--	--	0,82
2 Decenal {2E}	1266	B	--	--	--	--	--	2,05
2,4 Decadienal {2E,4Z}	1300	B	--	--	--	--	--	0,61
2,4 Decadienal {2E,4E}	1323	B	--	--	--	--	--	0,75
δ Elemeno	1344	C	0,35	0,41	0,18	0,17	0,47	0,22
α Cubebeno	1356	B	0,33	0,45	0,17	0,17	0,48	0,55
8-Undecenal {8Z}	1368	B	--	--	--	--	--	0,67
α Copaeno	1384	B	3,87	4,58	2,60	2,43	5,50	4,58
Cariofileno {Z}	1416	C	1,74	1,83	1,09	0,80	2,26	1,19
Cariofileno {E}	1430	B	13,73	15,88	10,35	9,94	17,77	12,34
β Farneseno	1439	B	--	--	--	0,07	--	--
α Amorfenos	1460	C	--	--	--	--	0,17	--
α Humuleno	1466	C	0,72	0,87	0,42	0,37	0,94	0,70
β Bisaboleno	1517	B	0,37	0,60	0,22	0,22	0,53	0,56
δ Amorfenos	1534	B	--	--	--	0,23	--	--
δ Cadineno	1535	C	0,45	0,64	--	--	--	--
Óxido de Cariofileno	1598	B	--	--	--	--	--	0,50

Índice de Kovats calculado para coluna RTX-5.

Identificação: A, espectro de massa (com similaridade maior de 85%, nas bibliotecas Wiley 8 e/ou FFNSC1.3) e tempo de retenção igual ao padrão (positivamente identificado); B, espectro de massa (com similaridade maior de 85% na biblioteca FFNSC1.3), índice de Kovats calculado está de acordo com a biblioteca FFNSC1.3 (Flavour and Fragrance Natural and Synthetic Compounds) e os bancos de dados Flavornet (www.flavornet.org) e/ou Pherobase (www.pherobase.com); C, espectro de massa (com similaridade maior de 85% na biblioteca Wiley 8), índice de Kovats calculado está de acordo com os bancos de dados Flavornet (www.flavornet.org) e/ou Pherobase (www.pherobase.com);

4 DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS CÁRNEAS PELA AÇÃO DE BACTERIAS LÁTICAS AUTÓCTONES COM DESENVOLVIMENTO DE SABOR EM SALAMES TIPO ITALIANO COM BAIXO TEOR DE SÓDIO

Resumo

O sabor típico dos salames é produzido em parte por compostos provenientes da degradação das proteínas de carne, tais como pequenos peptídeos e aminoácidos livres. A fim de melhorar e padronização dos produção dos salame, durante as ultimas décadas buscou-se utilizar culturas iniciadoras. As bactérias láticas (LAB) e os Cocos Gram positivos coagulase negativa (CGC) constituem os grupos mais comuns de bactérias usadas como cultura starter. Neste estudo, utilizou-se o modelo experimental Beaker Sausage (BS) para simular a produção de salame com baixo teor de sódio e assim avaliar o efeito de quatro diferentes culturas starters sobre a proteólise da carne, com uma abordagem peptidômica. Neste estudo observa-se uma intensa degradação das proteínas, provocada pela ação do micro-organismo em um ambiente com baixo teor de sódio e com relação a produção de peptídeos, um total de 103 foram precisamente identificados. O BS - Cps contendo *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus pentosaceus* apresentou a maior variedade de peptídeos, seguido pela BS contendo *Enterococcus mundtii* CRL35, *L. curvatus* CRL1862 e *Lactobacillus plantarum* CRL681. A alta quantidade de peptídeos produzida nos BS inoculados permite concluir que os conteúdos mais baixos de sódio não afetou negativamente a ação das peptidases microbianas. Essa ação também foi observada na produção de aminoácidos, devido ao fato de todos os BS inoculados com LAB + CGC conseguiram produzir após o período de fermentação/incubação 3 - 4 vezes mais aminoácidos que o controle. Porém deve-se avaliar em projetos futuros o quanto seria benéfico esses produtos da degradação da proteína para o desenvolvimento de aroma nestes produtos

Palavras-chave: Produtos cárneos fermentados; Culturas starters proteolíticas; Peptidômica; Aminoácidos; Peptídeos

Abstract

The typical flavor of fermented sausages is produced in part by compounds coming from meat protein degradation, such as small peptides and free amino acids. In order to improve and standardize salami production, the use of starter cultures has been extended during the last decades. Lactic acid bacteria (LAB) and Coagulase negative Gram positive Cocci are the most common groups of bacteria constituting starter cultures. In this study Beaker Sausage (BS) models were used to simulate the production of salami with low-sodium contents to evaluate the effect of four different starter cultures on meat proteolysis, by a peptidomic approach. In this study, it is possible to observe an intense protein degradation, consequence of microorganisms action on a low-sodium environment and related to peptides production, a total of 103 peptides were accurately identified. The BS containing *Enterococcus mundtii* CRL35 showed the highest variety of small peptides followed by the BS

containing *L. curvatus* CRL1862. Although the meat model inoculated with *Lactobacillus plantarum* CRL681 produced the highest number of peptides derived from sarcoplasmic proteins. The high quantity of peptides produced on LB inoculates allows us to conclude that the lowest sodium contents did not affected negatively the microbial peptidase's action. This action has also been observed in amino-acids production, due to the fact that all LAB + CGC inoculates on BS were able to originate 3-4 times more aminacids than the control after the fermentation/incubation period. However, future projects should evaluate how beneficial these protein degradation products are to the aroma development within the products.

Keywords: Fermentated sausages; Proteolysis starter culture; Peptidomics; Aminoacids; Peptides

4.1 Introdução

O Salame consiste em um produto de longa tradição na Europa nos países do Mediterrâneo e que se se expandiu para outros países com a imigração dessas populações, que levaram esta tradição para países como o Brasil, Estados Unidos e Argentina (COMI et al., 2005; TALON et al., 2008). Para elaboração desses produtos, utiliza-se basicamente carne suína, carne suína e toucinho misturado com sal e especiarias (COCOLIN et al., 2009).

A fim de se obter um salame seguro, no que diz respeito à sua microbiologia, a produção deste produto fermentado envolve uma combinação de condições, como por exemplo, baixo pH e atividade da água, adição de sais de cura e presença da microbiota competitiva (GOUNADAKI et al., 2007). Durante muito tempo, que a fermentação desejável no salame ocorria espontaneamente, no entanto, com os avanços tecnológicos de produção, começou-se a utilizar culturas de iniciadoras, tendo como base as bactérias lácticas e os Cocos Catalase Gram positivos coagulase negativa (CGC)

A principal vantagem da adição de LAB é de se produzir uma fermentação padronizada e rápida durante os primeiros dias de produção (fase de fermentação), através da produção de ácido láctico. A queda do pH contribui para as alterações químicas e físicastípicas para esse tipo de produto e para o desenvolvimento do sabor provocado pela proteólise (FADDA et al., 2010). Por outro lado, os CGC contribuem, especialmente durante o processo maturação, melhorando o sabor, principalmente através de degradação de aminoácidos e ácidos graxos. Outra contribuição

importante dos CGC é a desejada cor vermelha, devido à sua atividade nitrato redutora (LEROY et al., 2006).

A qualidade do salame é determinada pela formação de produtos finais provenientes da degradação das proteínas, lipídeos e carboidratos sob a ação das enzimas endógenas musculares e bacterianas. O conhecimento da ação dessas enzimas permitem a seleção de uma melhor combinação de carnes e culturas iniciadoras de modo a melhorar o sabor e a segurança de produtos cárneos fermentados (MOLLY et al., 1997). Os componentes não-voláteis, tais como os peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos fornecem sabores básicos, tais como doce, salgado, azedo, amargo. Estes compostos são produzidos durante a hidrólise das proteínas da carne e contribuem nas características sensoriais no produto final (CHEN et al., 2015).

Tem sido demonstrado *in vitro* como as Bactérias lácticas (BL), em particular *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus curvatus* são capazes de hidrolisar as proteínas sarcoplasmáticas e em menor intensidade as miofibrilas, gerando pequenos peptídeos e aminoácidos que atuam diretamente na formação de aroma e sabor ou como precursores de outros compostos que contribuem para a formação do perfil sensorial do produto final (FADDA et al., 1998). O objetivo deste estudo foi analisar a degradação das proteínas da carne e dos compostos responsáveis pela produção do sabor em um modelo "*beaker sausage*", inoculadas com diferentes combinações de LAB com *S. vitulinus* GV318 (GCC), a fim de selecionar a combinação de cepas mais eficientes para ser utilizada como cultura iniciadora para a produção de salames com baixo sódio.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Culturas bacterianas

Duas cepas de *Lactobacillus plantarum* CRL 681, *Lactobacillus sakei* CRL1862, uma cepa de *Enterococcus mundtii* CRL35, uma cepa de *Staphylococcus vitulinus* GV 318 pertencente ao Centro de Referencia para Lactobacilos – CERELA, Argentina e uma cultura starter comercial liofilizada (1 g diluída 5mL de caldo MRS) foram usadas neste projeto. A partir de cepas congeladas a -20°C, a ativação aconteceu em meios de cultura líquido

usando Mann Rogosa Sharp (MRS) para *L. plantarum*, *L. sakei* e a cultura starter; LAPTg para o *Enterococcus mundtii* CRL35 e "Brain Heart Infusion" para o *Staphylococcus vitulinus* GV 318 que foram incubados por um período de 12 horas a temperatura de 30°C (para o *Staphylococcus vitulinus* a temperatura foi de 30°C com o uso de agitação).

4.2.2 Ensaio de compatibilidade entre as cepas

A determinação da compatibilidade entre as cepas de LAB com o *Staphylococcus vitulinus* foi realizada através de um ensaio em placa com ágar pelo método de "spot" (SCHILLINGER; LÜCKE, 1989). Após a ativação, foram estabelecidos dois repiques com um período de 12 horas cada para o uso das cepas no ensaio de compatibilidade.

Para a preparação da camada superior, 10 ul da cultura foi inoculada ativada em um tubo contendo 10 ml de ágar (0,75% ágar) semi-sólido correspondente com o meio usual para cada cepa (com a temperatura de 40°C). Uma base sólida com ágar foi elaborada na placa e 5 ul do sobrenadante de cada cepa em estudo foi adicionada na placa.

4.2.3 Modelo experimental Beaker sausage (BS)

Todas as operações foram realizadas numa câmara de fluxo laminar. Das porções musculares *Longissimus dorsi* suíno (70%) e *Semimembranosus* bovino (30%), retirou-se assepticamente com o uso de facas esterilizadas a porção interna desses músculos e na sequência foram triturados em processador de acordo com a metodologia descrita por Vignolo et al. (1996)

Os aditivos usados foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121°C por 15 minutos, com exceção das soluções concentradas de nitrito de sódio, eritorbato de sódio e nitrato de sódio que foram previamente esterilizados através de filtros de 0,22 µm (Millipore, Billerica, USA). As concentrações adicionadas à carne previamente triturada foram 1.0% de NaCl, 0,25% de KCl e 0,25% de CaCl₂ (esses últimos dois sais, substitutos usados para a redução do do NaCl), 0,75% dextrose; 0,75% sacarose, 0,015% nitrato de sódio, 0,015% nitrito de sódio e 0,5% eritorbato de sódio.

Cinco tratamentos foram preparados: BS *control* adicionado de antibióticos (20.000 UI/Kg penicilina, 20 mg/Kg estreptomicina, 50 mg/Kg anfotericina B e 0.01% azidra sódica) (Gibco, Grand Island, USA), BS-Lps-681 inoculado com *L. plantarum* CRL 681 + *S. vitulinus* GV 318 (7-8 log CFU/g), BS-Lss-1862 inoculado com *L. sakei* CRL1862 + *S. vitulinus* GV 318 (7-8 log CFU /g), BS-Ems-35 inoculado com *Enterococcus mundtii* CRL35 + *Staphylococcus vitulinus* GV 318 (7-8 log CFU/g) e BS – Csp inoculado com a cultura starter comercial contendo *Staphylococcus xylosus* *Pediococcus pentosaceus*). Porções de 30 g foram acondicionadas em tubos esterilizados e incubados a 22°C. Foram realizadas análises (tubos em triplicatas) nos tempos de incubação 0, 3, 6 e 10 dias.

4.2.4 Contagem micorbiologia e medidas de pH

Dez gramas de cada *beaker sausage* foram misturados com 90 ml de água de peptona à 0,1% estéril (Britania, Buenos Aires, Argentina) e homogeneizados por 8 minutos em um stomacher (Lab blender 400, Seward medical, London, U.K.). Diluições decimais apropriadas de cada amostra foram preparadas e plaqueadas em duplicata em meios seletivos para crescimento microbiano. Foram utilizados os seguintes meios e condições: Plate Count Ágar (PCA) e MRS ágar (Britania, Argentina) a 30 °C durante 48 h para os micro-organismos mesófilos totais e bactérias lácticas respectivamente Mannitol Salt Ágar (MSA) a 37°C por 48 h para CGC. Os valores de pH foram obtidos através da inserção diretamente do sensor do equipamento (Meat pHmeter, Hanna Instruments Argentina, Buenos Aires, Argentina) em diferentes partes da amostra de BS.

4.2.5 Extração das proteínas e aminoácidos solúveis

Uma porção de 2,5 g de cada *beaker sausage* foi homogenizada em stomacher durante 8 min com 12,5 ml de HCl à 0.1N de acordo com a metodologia descrita por Minkiewicz et al. (2008) e Panchaud et al. (2012). Esse extrato foi transferido para tubos e centrifugado por 15 min a 13.500 rpm com uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi filtrado em papel Whatman e dividido em eppendorfs e essas amostras foram congeladas (-20°C) para futuras análises.

4.2.6 Análise de proteína total

A concentração protéica das amostras foi determinada pelo Bio-Rad Protein teste (Bio-Rad, Hercules, CA) utilizando albumina de soro bovino como padrão. Os resultados foram obtidos em duplicata e expressos em mg de proteína/ml.

4.2.7 Análise de aminoácidos livres por RP-HPLC

Para essa análise foi utilizado o HPLC Shimadzu com coluna Gemini 5 μ (150 x 4.6mm) e pré-coluna com filtro pré-coluna. Para a fase móvel foram utilizados: Fase A, NaH₂PO₄ (40mM) pH 6.4 e fase B, CH₃CN/MeOH/H₂O (45:45:10). As condições de equipamento foram as seguintes: taxa de fluxo de 1.0 ml/min, volume de injeção 1 μ L, com T° 40°C e uma pressão inicial de 9 MPa e um detector fluorimétrico @340 nm / 460 nm. As amostras foram derivatizadas (1:1) 60 segundos antes da injeção com o-ftaldialdeído (OPA). A composição do reagente de derivatização foi a seguinte: Metanol- MeOH (1,25mL), tampão borato pH 10 (1,25mL), OPA (20mg) e 3-ácido mercaptopropiónico (3-MPA). As amostras congeladas foram diluídas 50 vezes e injetadas em duplicata. Este método de análise cromatografica permitiu a detecção dos seguintes aminoácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), histidina (His), glutamina (Gln), glicina (Gly), treonina (Thr), arginina (Arg), alanina (Ala), ácido gama-aminobutírico (GABA), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), triptofano (Trp), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), ornitina (Orn) e lisina (Lys). Estes aminoácidos foram identificados nas suas concentrações iniciais nos tempos (0 h) 3, 6, e 10 dias de incubação.

4.2.8 Eletroforese em gel de Tricina Sodium Dodecil Sulfato em Poliacrilamida (Tricine SDS – PAGE)

Amostras contendo proteínas sarcoplasmáticas correspondentes as diferentes lotes dos BS nos tempos 0 h, 6 e 10 dias de incubação foram diluídas 1:1 com o tampão contendo 8M urea; 2M tiurea; 0.05M Tris; 75 mM DTT; 3% SDS; 0.05% azul de bromofenol (pH 6.80) e aquecidas a 100°C por 5 min antes da eletroforese. Tricina-SDS-PAGE (17% acrilamida-bisacrilamida para o gel de resolução e 3% acrilamida-bisacrilamida para o gel de

stacking) foi realizada usando o equipamento de eletroforese Miniprotean II (Bio-Rad, Hercules, CA) colocando-se 20 µl de cada amostra nos poços e usando marcadores de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) (SCHÄGGER, 1987). A eletroforese foi conduzida com 50 e 70 V para gel de *stacking* e resolução, respectivamente. Os géis foram corados com Biosafe Coomassie Blue (Biorad, USA) e lavados com água destilada.

4.2.9 Extração dos peptídeos de baixo peso molecular

A partir de 2,5 g de cada *beaker sausage* foram homogeneizadas em um *stomacher* durante 8 min com 12,5 ml de HCl a 0.1N de acordo com o descrito por Sentandreu et al. (2003). Esse extrato foi centrifugado (13500 rpm a 4°C por 20 min) e os sobrenadantes foram submetidos a ultra-filtração com Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter com membrana Ultracel-3 (Millipore, Billerica, USA). O filtrado obtido contendo os peptídeos com baixo peso molecular (menores que 3kDa) foi congelado a – 20 °C durante 24 h e posteriormente foram liofilizados.

4.2.10 Identificação da sequência de peptídeos por LC-ESI-MS/MS

Amostras liofilizadas correspondente aos peptídeos menores que 3 kDa foram redissolvidas em 1 ml de 0.1% ácido trifluoroacético (TFA). Vinte e cinco microlitros desta solução foram injetados em um sistema de cromatografia líquida Surveyor LC diretamente acoplado a um espectrometro de massas Ion trap LCQ Advantage (Thermo Scientific, San Jose, CA). A separação dos peptídeos foi realizada em uma coluna de fase reversa modelo Jupiter Proteo (150 x 0.5 mm; Phenomenex, Torrance, CA), usando as seguintes condições: gradiente linear de 0 a 40% Acetonitrila em 0.1% ácido fórmico por 140 min a uma taxa de fluxo de 30 µL/min. Os parâmetros de operação do detector de íons foram os seguintes: ionização de eletrospray em modo positivo, temperatura do capilar 250 °C, energia de colisão normalizada para 35%, voltagem do spray 4,5 kV e voltagem do capilar em 33,0 V. No primeiro evento de varredura, foram detectados os espectros MS com a relação m/z de valores entre 400 a 2000. O segundo evento foi dependente de uma seleção dos íons mais intensos dos espectros MS/MS com carga de +2 a +4, permitindo uma exclusão dinâmica depois de três varreduras do íon

mais intenso por um período de 5 minutos. A intensidade mínima do íon para acionar a varredura MS/MS foi 5×10^5 . Para a aquisição dos dados utilizou-se o software Xcalibur v2.0. A identificação dos peptídeos foi feita a partir da informação gerada pelo espectro MS/MS usando uma versão doméstica do software de busca Mascot engine v2.3 (www.matrixscience.com) contra o banco de dados Uniprot KB (www.uniprot.org). Definiu-se os seguintes parâmetros de busca: Enzima: "none" como modificações não fixadas, modificações variáveis: "Desamidação (NQ) "e" Oxidação (M)". Exatidão de massa foi de 1.2 e 0.6 Da para modo MS e MS/MS, respectivamente. A opção "Mammalia" foi selecionada para a restrição dos parâmetros de taxonomia. Para a seleção e identificação dos espectros MS/MS obtidos com o Mascot, somente os peptídeos melhores classificados foram considerados, tomando como referência peptídeos de pontuação mínima de 25 para considerar uma sequência válida. As identificações selecionadas que seguiram esse critério foram ainda verificadas manualmente. Identificações de peptídeos não foram consideradas nos casos onde não houve adequada correlação dos diversos íons (pelo menos em parte de toda sequência peptídica) ou nos casos nos quais os espectros MS/MS foram de baixa qualidade (picos com relação sinal ruído muito baixa).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Desempenho das cepas selecionadas no modelo BS

Após a fermentação e inoculação dos beaker sausages, todas as cepas de LAB mostraram um crescimento ideal com uma queda de pH desejável (Figura 4.1). Em geral, os valores de pH atingiram ao redor de 4,7 - 5,1 com três dias de fermentação e de 4,7 - 4,8 com dez dias de maturação.

No entanto, a BS-Ems-35 mostrou uma menor diminuição do pH, quando comparada com os outros BS inoculados, atingindo 5,4 e 5,1 com 3 e 10 dias, respectivamente. Esta acidificação mais moderada, era esperada devido ao fato desta cepa *E.mundtii* CRL35, ter um menor potencial de acidificação (VILDOZA et al.,¹).

¹Dados não publicados, pesquisa em andamento.

Figura 4.1 - Declínio do pH durante o tempo de incubação para os BS em estudo

Em geral os valores de pH observados indicaram que os carboidratos selecionados e suas concentrações (0,75% de glicose e 0,75% de sacarose) foram satisfatórios para alcançar uma acidificação adequada nas condições propostas neste estudo. A fermentação dos carboidratos realizada pelas LAB é essencial para elaborar uma barreira contrária ao crescimento de micro-organismos indesejáveis em produtos cárneos fermentados. Além disso, a fermentação propicia um ambiente acidificado e com o metabolismo das LAB contribuem para a degradação das proteínas cárneas, bem como auxiliando na atividade proteolítica das enzimas endógenas do músculo (HUGHES, et al., 2002; FADDA, et al., 2010).

Com relação a contagem microbiana nas placas com meio MSA (para verificar a concentração do *Staphylococcus vitulinus* GV 318) os tratamentos BS-Lps-681 e BS-Lss-1862 partiram de uma contagem inicial de 7 logUFC/g respectivamente, o tratamento BS-Ems-35 partiu de uma contagem inicial de 8 log UFC/g e para a BS – Cspa sua contagem inicial foi de 6 log UFC/g de acordo com o método descrito. Nas amostragens nos

tempos 6 e 10 dias de incubação, não foram detectadas contagens para o BS-Lps-681. Enquanto que para oBS-Lss-1862, BS – Csp e BS-Ems-35 a contagem foi de 3 log - 6 log UFC/g com 6 dias de incubação e 4 log - 5 log UFC/g com 10 dias de incubação. A presença de contagens elevadas do *Staphylococcus vitulinus* ou do *Staphylococcus xylosus* (no caso do BS – Csp) é de grande importância para produtos cárneos fermentados, devido ao fato deste tipo de micro-organismo contribuir para a lipólise dos triglicerídeos. Pode-se dizer que o crescimento destes micro-organismos em todos os tratamentos foi razoável, com contagens oscilando entre 3 a 6 log e de acordo com o descrito pela literatura, (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006) o tratamento menos acidificado (BS-Ems-35) foi o que manteve a maior contagem desde a inoculação até o término da incubação para este micro-organismo.

4.3.2 Degradação da proteína e produção de compostos relacionados ao sabor

Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (Tricine SDS – PAGE)

Perfis de proteínas sarcoplasmáticas dos diferentes modelos de *beaker sausage* foram analisados utilizando-se a técnica de Tricine-SDS-PAGE a fim de estabelecer padrões adequados da degradação das proteínas na faixa de peso molecular entre 66 e 14kDa. Os *beaker sausages* em estudo (inoculados ou não com as culturas iniciadoras), correspondente aos tempos de incubação 0, 6 e 10 dias encontram-se descritos na Figura 4.2.

Uma evidente degradação da proteína foi observada com 6 dias de incubação, principalmente nos BS inoculados com culturas iniciadoras, enquanto nenhuma degradação substancial foi detectada nas amostras controle (BS-control) com 6 e 10 dias de incubação. Estes resultados permitem inferir a contribuição das LAB e CGC na proteólise, como foi relatado anteriormente por Lopez et al. (2015a, 2015b). Em geral, para os BS inoculados com cepas de LAB e CGC, ocorreu uma alta degradação nas proteínas da região entre 36 - 24 kDa, com uma alta diminuição da intensidade das bandas. Na região de 24 - 14 kDa uma degradação menos intensa foi observada no BS inoculados (Figura 4.2), embora observa-se

algumas pequenas bandas produzidas possivelmente à partir da hidrólise de proteínas maiores.

Figura4.2 – Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS – PAGE) perfis obtidos dos Beaker Sausage (BS) após incubação à 22°C. Std: Marcador de baixo peso molecular

Aos dez dias de incubação, a degradação das bandas dos BS contendo LAB + CGC foi mais intensa. Quando compara-se a degradação proteolítica entre as diferentes combinações das cepas em estudo, o BS contendo a cepa *L. plantarum* CRL 681 (BS-Lps-681) demonstrou-se uma maior hidrólise aos 10 dias de incubação, seguido pelo BS-Lss-1862 e pela cultura starter comercial (BS-Cps) enquanto o BS-Ems-35 apresentou menor hidrólise. O diferente grau de degradação da proteína está relacionado com os valores finais de pH e isso pode ser evidenciado pela menor degradação das bandas no BS-Ems-35 (com a combinação de cepas *E. mundtii* CRL35 + *S. vitulinus* GV - 318) e também corrobora a menor habilidade desta cepa em produzir ácido.

Outros autores relataram queo ambiente ácido, consequência da fermentação provocada pelas LAB pode promover a ativação das proteases musculares e assim a degradação das proteínas musculares (HUGHES et al., 2012; FADDA et al., 2010). Deve-se ressaltar que os salames com baixo teor de sódio tendem a ser menos saborosos que o mesmo produto com quantidade usual de sódio. Portanto, a adição de cepas de CGC, poderia contribuir melhorando o sabor, devido a suas características de intensificar o aroma e o sabor de produtos cárneos fermentados.

Neste sentido, a contribuição na proteólise provocada pela adição das culturas iniciadoras utilizadas pode ser evidenciada neste estudo. Deste modo, em ambiente com baixo teor de sódio, as cepas *L. plantarum* CRL681(BS-Lps-681); *L. sakei* CRL1862 (BS-Lss-1862) e *E. mundtii* CRL35 (BS-Ems-35) em combinação com *S. vitulinus* GV-318 produziram uma hidrólise protéica semelhante ou maior que a produzida pela cultura starter comercial (BS - Csp). O cloreto de sódio em concentração elevada interfere na taxa de degradação de proteínas em produtos curados (SENTANDREU et al., 2007), assim, em salames com baixo teor de sódio, as culturas iniciadoras cuidadosamente selecionadas, poderiam contrabalancear esse efeito, assegurando uma proteólise desejável, garantindo uma textura adequada e um bom desenvolvimento de sabor característico para esse tipo de produto.

4.3.3 Peptídeos de baixo peso molecular derivados das proteínas nos Beaker Sausage em estudo

Sequência de peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS

Neste estudo, os peptídeos de baixo peso molecular (<3 kDa) de todos os modelos BS em estudo foram submetidas a análise por LC-ESI-MS / MS de modo a se identificar o peptidoma da carne fermentada. A sequência de aminoácidos obtidos foram comparados com um banco de dados, de modo a se obter um peptídeo com uma faixa de certeza 70–100%. Assim por comparação obteve-se a proteína que derivou o respectivo peptídeo. Neste estudo, um total de 108 peptídeos foram identificadas e na Tabela 4.1 encontram-se descritos os peptídeos identificados no BS - Control com 0 dias de incubação.

Tabela 4.1 - Sequência de peptídeos gerados no BS - Control no tempo 0 dias de incubação

Sequência	Posição*
DDVIQTGVDNPGHPF	54 - 68
DVIQTGVDNPGHPF	55 - 68
DVIQTGVDNPGHPFI	55 - 69
NRTPIPWLSSGEPVD	267 - 281
TPIPWLSSGEPVD	269 - 281

(*) posição na proteína de origem

Os três primeiros descritos na Tabela 4.1 foram originados da degradação da Creatine quinase tipo M e os demais peptídeos foram originados da degradação da Miozenina - 1 (MYOZ1) do músculo de bovinos. Assim, devido as características desse BS - Control pode-se afirmar que esses peptídeos são produtos da atividades da peptidase do músculo durante o processo de *post-mortem* como demonstrado por outros autores que relataram que as enzimas endógenas também estão envolvidas na produção de pequenos peptídeos, especialmente derivados de actina e miosina (SENTANDREU, et al., 2003; LÓPEZ et al., 2015a).

Após 10 dias de incubação, identificou-se cinco peptídeos no BS não inculado (BS-control) que encontram-se descritos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Sequência de peptídeos identificados no BS - Control no tempo 10 dias de incubação

Sequência	Proteína	Posição*
FAGDDAPRAVFPSIVG	α -Actina (músculo esquelético)	23 - 38
FAGDDAPRAVFPSIVGRPR		23 - 41
DDAPRAVFPSIVG		26 - 38
WITKQEYDEAGPSIVH		358 - 373
CVLVSEEDEHAIIVEPE	Frutose -1,6-bisfosfatase 1	93 - 109

(*) posição na proteína de origem

De acordo com a pouca quantidade de peptídeos de baixo peso molecular identificados no BS - Control após dez dias de incubação, pode-se dizer que ocorreu uma baixa atividade da peptidase e esses resultados discordam do estudo de Lopez et al. (2015a) que identificou um grande número de peptídeos em seu tratamento BS não inoculado. Os resultados contraditórios, podem ser explicados pela alta concentração de sódio usada no estudo citado anteriormente o qual colaborou com a atividade da peptidase muscular finalizando com a produção de peptídeos de baixo peso molecular.

Após os dez dias de incubação, observou-se que os peptídeos FAGDDAPRAVFPSIVG e DDAPRAVFPSIVG identificados no BS - Control também foram identificados nos demais BS inoculados. Nesses BS inoculados, identificaram-se outros 13 peptídeos em comum e os mesmos encontram-se descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Sequência de peptideos identificados nos BS inoculados no tempo 10 dias de incubação

Sequência	Proteína	Posição*
DDAPRAVFPSIVGRPR		26 – 41
FPSIVG		33 – 38
TNWDDMEKIWHH		79 – 90
NWDDMEKIWHH	α -Actina (músculo esquelético)	80 – 90
WDDMEKIWHH		81 – 90
LEKSYELPDGQVIT		238 – 251
EKSYELPDGQVITIGN		239 – 254
YELPDGQVITIGNER		242 – 256
YELPDGQVIT		242 – 251
NVKNEELDAMMKEASGPIN		62 – 80
NEELDAMMKEASGPIN	Cadeia leve de miosina	65 – 80
FPPDVG		144 – 149
FPPDVGGNVD		144 – 153

(*) posição na proteína de origem

Esses resultados podem sugerir o sinergismo entre as combinações propostas neste estudo, ou seja, a combinação de um LAB com um CGC foi a responsável pela produção desses peptideos descritos na Tabela 3, devido ao fato de estes estarem presentes em todos os tratamentos inoculados (BS-Ems-35; BS-Lps-68; BS-Lss-1862 e BS – Csp) e não estarem presentes no BS - Control. Essa afirmação é justificada pelo baixo número de peptídeos identificados no BS - Control e pela grande quantidade identificada nos BS inoculados, demonstrando uma alta atividade das enzimas produzidas pelos micro-organismos inoculados ou pela condição gerada por esses que ativou as aminopetidases endógenas de origem muscular, produzindo os peptídeos de baixo peso molecular identificados.

Os peptídeos de baixo peso molecular produzidos nos BS inoculados com os diferentes micro-organismos demonstraram que a condição de baixo teor de NaCl permitiu uma maior ação das enzimas. Concentrações elevadas de NaCl tem a importante função de desnaturar as proteínas expondo as mesmas à ação das peptidases (SENTANDREU; TOLDRÁ, 2007). A concentração adicionada de NaCl (1,0%) juntamente com

a adição de KCl (0,25%) e CaCl₂ (0,25%) foi suficiente para promover a hidrólise das proteínas miofibrilares, fato que pode ser evidenciado pelos 11 peptídeos derivados da actina e 2 peptídeos derivados da miosina (Tabela 4.3) identificados de forma comum nos BS inoculados.

Para elucidar melhor os resultados, devido a grande quantidade de peptídeos identificados, nas Tabelas 4.4, 4.5 e 4.6 encontram-se descritos os 53 peptídeos originados exclusivamente em cada BS inoculado e no BS - Control sem inoculação. Com relação ao BS não inoculado (BS - Control) identificou-se apenas 2 peptídeos exclusivos, provenientes da actina e frutose-1,6-bifosfatase. Esses peptídeos certamente foram produzidos pela ação das enzimas endógenas

Tabela 4.4 - Peptídeos identificados no BS- Csp com 10 dias de incubação

Sequência identificada	Proteína	Posição*
A.APAPAPAPAPAPAPP.K	Cadeia leve de miosina musculoesquelético	15 - 31
T.GVDNPGH.P	Creatina quinase tipo M Bos taurus	60 - 66
Y.DTLGTDITYIVNKAELSVI.F	Ácido graxo de cadeia longa CoA ligase 1	180 - 199
K.FIIPNIVKYSPN.C	L-lactato desidrogenase A (Bos taurus)	119 - 130
K.PEVKKTAQNGLSAVPNGA.P	Adenilato ciclase tipo 3	497 - 516
T.VKAENGKLVINGKAI.T	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	58 - 76
N.IIPASTGAAKAVGKVIP.E		204 - 220
I.IPASTGAAKAVGKVIP.E		205 - 220
I.PASTGAAKAVGKVIPEL.N		206 - 222
L.DSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIM.R	Actina, músculo esquelético	156 - 178
L.DFENEMATAASSSSLEK.S		224 - 240
S.SLEKSYELPDGQVIT.I		237 - 251
S.SLEKSYELPDGQVITIGNER.F		237 - 256
E.KSYELPDGQVITIGNER.F		240 - 256
S.YELPDGQVITIGNERF.R		242 - 257
Y.ELPDGQVITIGNERF.R		243 - 257
G.DDAPRAVFPSIVGRPRH.Q		26 - 43
D.DAPRAVFPSIVGRPR.H		27 - 41
A.VFPSIVG.R		32 - 38
V.FPSIVGRPR.H		33 - 41
H.GIITNWDDMEKIWHH.T		76 - 90
G.IITNWDDMEKIWHH.T		77 - 90
G.IITNWDDMEKIWHHT.F		77 - 91
I.ITNWDDMEKIWHH.T		78 - 90
I.TNWDDMEKIWHHT.F		79 - 91

(.) os pontos indicam os locais de clivagem que originaram o péptideo; (*) posição na proteína de origem

Nos peptídeos originados exclusivamente nos BS com a presença de culturas iniciadoras, BS - CSp (Tabela 4.4) produziu 47,2% dos peptídeos identificados, 28,3% de BS-Ems 35 (Tabela 4.5), 16,9% de BS-Lps 681 (Tabela 4.6) e 7,6% de BS-Lss 1862 (Tabela 4.6) do total de peptídeos identificados. Neste contexto, observa-se que o BS contendo *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* (cultura starter comercial - BS - CSp), produziu 25 peptídeos originais sendo 64% derivadas de actina e 4% da miosina e uma porcentagem derivada de proteínas sarcoplasmáticas (Tabela 4.4).

Essa combinação de cepas utilizadas na cultura starter comercial foi desenvolvida para uso em condições usuais ou elevadas de NaCl. Entretanto, neste estudo como era de se esperar, a condição de baixo teor de NaCl não interferiu na proteólise do BS. Assim, outros estudos devem ser realizados a fim de verificar se essa alta produção é desejável ou não para a produção de salames com baixo teor de sódio usando culturas starters selecionadas para alto teor de NaCl

A combinação de cepas *E. mundtii* CRL 35 e *S. vitulinus* GV318 (BS-Ems35), produziu 15 peptídeos originais, sendo 46,7% derivados da miosina e 33,3% da actina e o restante derivados das proteínas sarcoplasmáticas (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Peptídeos identificados no BS-Ems35 com 10 dias de encubação

Sequência identificada	Proteína	Posição
T.LTVKEDQVFPMPNP.K	Miosina, tipo 2	70 - 83
L.TVKEDQVFPMPNP.K		71 - 83
G.RLNVKNEELDAMMKEASGPIN.F	Cadeia leve de miosina (Músculo)	60 - 80
R.LNVKNEELDAMMKEASGPIN.F		61 - 80
V.KNEELDAMMKEASGPIN.F		64 - 80
N.EELDAMMKEASGPIN.F		66 - 80
G.DVLRALGTNPNTNAEVKKVLGNPSN.E	Cadeia leve de miosina (músculo esquelético)	75 - 98
F.AGDDAPRAVFPSIVGRPR.H	α -Actina (músculo esquelético)	24 - 41
L.DFENEMATAASSSSLEKS.Y		224 - 241
A.ASSSSLEKSYELPDGQVIT.I		233 - 251
A.TAASSSSLEKSYELPDGQVITGNER.F		231 - 256
L.DSGDGVTHNVPIYEGYALPHA.I		156 - 176
E.RNVKMQRQEGAKVCLMSPEQLQKKFP.W	Oxiredutase dependente de FAD	173 - 198
N.KMIRKGVFKDQHFDPNLNFMYIEVDK.V	Proteína quinase serina/treonina PRP4	911 - 936
F.DPNLNFMYIEVDK.V		924 - 936

(.) os pontos indicam os locais de clivagem que originaram o péptideo; (*) posição na proteína de origem.

Com base nestes resultados, foi demonstrado que os BS inoculados tiveram uma maior influência sobre as proteínas miofibrilares. Esses resultados não estão de acordo com o descrito por Fadda et al. (2010) que observaram uma maior susceptibilidade de hidrólise em proteínas sarcoplasmáticas do que nas miofibrilares. Moraet al. (2012) e López et al. (2015b) em seus estudos com modelos fermentados experimentais, também identificaram uma grande quantidade de peptídeos de baixo peso molecular derivados de proteínas sarcoplasmáticas de amostras carnes.

Neste sentido, pode-se sugerir que a condição de baixo teor de NaCl e a adição de KCl + CaCl₂ produziu um ambiente favorável para a proteólise e ação das peptidases, justificando o elevado número de peptídeos de origem miofibrilar exclusivos dos BS-Ems 35 e BS - Cps.

As outras cepas de LAB estudadas, de uma forma geral, produziram uma menor quantidade de peptídeos exclusivos. Porém deve-se destacar que o BS com a combinação *L. plantarum* CRL681 + *S. vitulinus* GV 318 (BS-Lps 681) (Tabela 4.6) produziu 80% de seus peptídeos exclusivos derivados de proteínas sarcoplasmáticas. Essa linhagem de LAB possui como característica uma forte acidificação e nos BS em estudo, a mesma produziu uma drástica queda do pH levando a níveis próximos de 4,6 nos primeiros 3 dias de incubação. De acordo com as características desta linhagem de *L. plantarum* e o ambiente gerado por ela, produziu condições favoráveis a maior produção de peptídeos derivados das proteínas sarcoplasmáticas

Tabela 4.6 - Peptídeos identificados no BS-Lps 681 e BS-Lss1862 com 10 dias de encubação

Sequência identificada (BS-Lps 681)	Proteína	Posição
N.WDDMEKIWHHT.F	Miosina	
L.DDVQITGVDPNPGHPFI.M	Creatina Quinase tipo M	54 - 69
R.DWPDARGIWH.N		210 - 219
T.APPIQSPLPVIPH.Q	Domínio 3 de ligação à proteína LIM	93 - 105
T.APPIQSPLPVIPH.Q.K		93 - 106
Q.SPLPVIP.H		98 - 104
Q.SPLPVIPH.Q		98 - 105
V.MQRDIAAGDFIEHAEFSGNIYG.T	Guanilato Quinase	61 - 82
K.LRNKMTPSGYTLQCIQTGVDPNPGHPF.I	Creatina Quinase tipo S, mitocondrial	76 - 102
Sequência identificada (BS-Lss1862)	Proteína	Posição
A.AAPAPAPAPAPAPAPP.K	Cadeia leve de miosina musculo esquelético	14 - 31
A.AFPPDVGGNVD.Y		143 - 153
A.FPPDVGGNVD.Y		144 - 153
N.EMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNER.F	α -Actina (músculo esquelético)	228 - 256

(.) os pontos indicam os locais de clivagem que originaram o péptideo; (*) posição na proteína de origem

A presença de cada cepa de LAB e do CGC nos BS em estudo foi capaz de gerar um perfil único em condições de baixo teor de NaCl, que poderia servir como uma característica bioquímica distintiva para diferenciar determinados locais ou tipo de produção de salames. Assim, estes peptídeos podem ser utilizados como um biomarcador, tanto para sabor específico ou para a tecnologia aplicada (específica para a cultura starter utilizada).

Neste sentido, os resultados mostraram que a BS - Cps e BS-Ems35 obtiveram a maior capacidade peptidogenica. Segundo Lu, et al. (2006) a estrutura principal e a sequência de aminoácidos de um determinado peptídeo, estão relacionados com propriedades de sabor. Assim, podemos supor que BS-EMS 35 (*E. mundtii* CRL35 + *S. vitulinus* GV 318). A combinação de micro-organismos utilizadas neste ensaio poderá influenciar no sabor global de salames com baixo teor de sódio se for aplicada como cultura starter e pode-se dizer que essa combinação é a que mais se aproximou da cultura starter comercial.

Entretanto, devido ao fato da *E. mundtii* CRL35 ser compatível com as outras LAB utilizadas neste estudo, uma alternativa interessante seria utilizar essa combinação de cepa com uma outra LAB com característica

proteolítica e acidificante, como por exemplo a *L. sakei* CRL1862 que possui uma alta atividade proteolítica e uma produção de aminoácidos livres elevada (ALMEIDA et al., 2015). Esta combinação poderia constituir uma nova cultura starter para produtos fermentados com baixo teor de sódio.

Perfil de Aminoácidos livres

A proteólise consiste de uma das mudanças mais importantes que ocorrem durante a maturação dos Salames. A intensidade irá influenciar o desenvolvimento de sabor devido à formação de vários compostos de baixo peso molecular, incluindo peptídeos e aminoácidos. Alguns aminoácidos também estão relacionados como importantes precursores aromáticos

De modo a estudar os produtos produzidos pela proteólise durante a fermentação de modelos BS, os aminoácidos livres foram analisados e quantificados e estão descritos na Figura 4.3. Este estudo evidenciou a contribuição positiva de culturas iniciadoras para os produtos cárneos fermentados, assim foi realizada a soma de todos os aminoácidos por BS para comparar-se os inoculados com o BS sem inoculação (Controlo BS).

Figura 4.3 - Total de aminoácidos livres identificadas nos diferentes tratamentos durante o período de incubação

Após dez dias de incubação, observou-se que o BS-Lss-1862 obteve o maior aumento de aminoácidos livres totais, com um aumento

próximo de 87% desses aminoácidos deste o tempo 0 até os 10 dias de incubação. O BS-Lps-681 também conseguiu uma alta produção de aminoácidos com 82%, seguido pelo BS-Ems-35 com 79% e do BS – Csp com 75%. Aos dez dias de incubação quando compara-se com o controle (BS - Control) verifica-se a grande influencia da adição de culturas iniciadoras em produtos cárneos fermentados, com os BS inoculados produzindo de 3 a 4 vezes mais aminoácidos que o controle. Deve-se ressaltar também que as combinações propostas (LAB + CGC) foram similares, não existindo diferença estatística entre os BS inoculados ($p > 0,05$).

O presente estudo, utilizou cepas muito proteolíticas o que pode confirmar-se com a alta quantidade de aminoácidos produzidos, porém deve-se observar que no caso da produção de salames maturados, o interesse é a produção de aminoácidos relacionados com o sabor. Assim de modo a elucidar melhor os resultados elaborou-se dois gráficos (Figura 4.4 e 4.5) com o perfil de aminoácidos nos tempos 0 e 10 dias.

Figura 4.4 - Perfil de aminoácidos livres nos BS em estudo com 0 dias de incubação

Acido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), histidina (His), glutamina (Gln), glicina (Gly), treonina (Thr), arginina (Arg), alanina (Ala), ácido gama-aminobutírico (GABA), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), triptofano (Trp), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), ornitina (Orn) e lisina (Lys)

Segundo Matthew et al. (1996) alguns aminoácidos tem uma maior influência no sabor, como o sabor umami do ácido glutâmico, o sabor amargo da leucina, sabor adocicado da alanina e que a combinação de valina e lisina seria responsável pela produção de sabor doce/amargo. Observa-se que todos os BS em estudo possuíam uma concentração normal de aminoácidos relacionados ao sabor (aminoácidos grifados em vermelho). Porém após dez dias de incubação (Figura 4.5), a quantidade de aminoácidos aumentou em todos os BS inoculados e no BS sem inóculo, como o esperado, ocorreu um pequeno aumento, devido a atividade das peptidases musculares.

Com relação aos aminoácidos mais relacionados ao sabor (Glu, Ala, Val, Leu e Lys), observou-se uma tendência similar entre esses aminoácidos com o descrito no parágrafo anterior. No entanto, quando observa-se os BS de forma separada, o BS-Lss-1862 apresentou uma maior produção dos aminoácidos lisina, leucina, valina e ácido glutâmico, demonstrando que essa combinação de cepas tem uma maior afinidade na produção aminoácidos relacionados ao sabor, seguidos pelo BS-Lps-681, BS – Csp e BS-Ems35.

Figura 4.5 - Perfil de aminoácidos livres nos BS em estudo com 10 dias de incubação

Acido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), histidina (His), glutamina (Gln), glicina (Gly), treonina (Thr), arginina (Arg), alanina (Ala), ácido gama-aminobutírico (GABA), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), triptofano (Trp), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), ornitina (Orn) e lisina (Lys)

Nesta Figura 4.5, também pode-se observar a grande influência das culturas em estudo com relação a degradação e produção de aminoácidos. Isto pode ser explicado pelo fato que o controle produziu uma quantidade bem menor de aminoácidos. Enquanto que a concentração mais elevada de aminoácidos observados nos modelos inoculados está de acordo com o perfil de degradação de proteína observados no SDS-PAGE. Deve-se observar também que essas cepas em outros estudos (FADDA et al., 1999), provocaram uma intensa degradação da proteína com produção considerável de aminoácidos.

4.5 Conclusão

A utilização de concentrações mais baixas de sódio para o preparo de salames poderia ter um efeito positivo adicional com relação a produção de peptídeos e aminoácidos relacionados ao sabor durante a maturação.

Porém deve-se avaliar em projetos futuros o quanto seria benéfico esses produtos da degradação da proteína para o desenvolvimento de aroma nestes produtos.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Projeto 2012/07113-2. Obrigado ao Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET) pelo fornecimento da cepas e pelo apoio e ao projeto AGL2012-32146 da MINECO (Espanha). Também gostaria de agradecer a Christian Hansen, IBRAC e Cryovac que forneceram as culturas iniciadoras, aditivos e embalagens, respectivamente.

Referências

- ALMEIDA, M.A.; FADDA, S.G.; VILLANUEVA, N.D.M.; RIBEIRO, F.A.; PINTO, J.S.S.; CONTRERAS CASTILLO, C.J. Development and in vitro beaker sausage evaluation for select natural strain for proteolytic activity in low salt dry sausages. **Meat Science**, Barking, v. 101, p. 114–115, 2015.
- CHEN, Q.; LIU, Q.; SUN, Q.; KONG, B.; XIONG, Y. Flavour formation from hydrolysis of pork sarcoplasmic protein extract by a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage. **Meat Science**, Barking, v. 100, p. 110–117, 2015.
- COCOLIN, L.; DOLCI, P.; RANTSIOU, K.; URSO, R.; CANTONI, C.; COMI, G. Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as produced in the North of Italy as determined by molecular methods. **Meat Science**, Barking, v. 82, p. 125-132, 2009.
- COMI, G.; URSO, R.; IACUMIN, L.; RANTSIOU, K.; CATTANEO, P.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Characterization of naturally fermented sausages produced in North East of Italy. **Meat Science**, Barking, v. 69, p. 381-392, 2005.
- FADDA, S.; LÓPEZ, C.; VIGNOLO, G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as a sensorial and hygienic biomarkers. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 1, p. 66-79, 2010.
- FADDA, S.; VIGNOLO, G.; OLIVER, G. Protein degradation by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in a sausage model system. **Food Science**, London, v. 67, n. 3, p. 1179-1183, 2002.

FADDA, S.; VILDOZA, M.J.; VIGNOLO, G. The acidogenic metabolism of *Lactobacillus plantarum* CRL 681 improves sarcoplasmic protein hydrolysis during meat fermentation. **Journal of Muscle Foods**. Trumbull, v. 21, p. 545–556, 2010.

FADDA, S.; ANGLADE, P.; ZAGOREC, M.; TALON, R.; VIGNOLO, G.; CHAMPOMIER-VERGÈS, M.C. Adaptive response of *Lactobacillus sakei* 23K during growth in presence of meat extracts: a proteomic approach. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 1/2, p. 36-43, 2010.

FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006

GOUNADAKI, A.S.; SKANDAMIS, P.N.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.-J.E. Effect of packaging and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on sliced salami. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 10, p. 2313-2320, 2007.

HUGHES, M.C.; KERRY, J.P.; ARENDT, E.K.; KENNEALLY, P.M.; MCSWEENEY, P.L.H.; O'NEILL, E.E. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. **Meat Science**, Barking, v. 62, p. 205–216, 2002.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; DE VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 270–285, 2006.

LÓPEZ, C.M.; BRU, E.; VIGNOLO, G.M.; FADDA, S.G. Identification of small peptides arising from hydrolysis of meat proteins in dry fermented sausages. **Meat Science**, Barking, v. 104, p. 20–29, 2015a.

LÓPEZ, C.M.; SENTANDREU, M.A.; VIGNOLO, G.M.; FADDA, S.G. Low molecular weight peptides derived from sarcoplasmic proteins produced by a native autochthonous starter culture in a beaker sausage model. **EuPA Open Proteomics**, London, v. 82, p. 1-10, 2015b.

LU, C.Y. **Peptides as flavour precursors in Maillard reaction**. New Jersey: New Brunswick Rutgers, 2006. 132 p.

MOLLY, K.; DEMEYER, D.; JONHANSON, G.; RAEMAEEKERS, M.; GHISTELINCK, M.; GEENEN, I. The importance of meat enzymes in ripening and flavor generation in dry fermented sausages: First results of a European project. **Food Chemistry**, London, v. 59, p. 539-545, 1997.

MINKIEWICZ, P.; DZIUBA, J.; DAREWICZ, M.; IWANIAK, A.; DZIUBA, M.; NAŁECZ, D. Food peptidomics. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 46, p. 1–10, 2008.

MORA, L.; TOLDRÁ, F. Proteomic identification of small (<2000 Da) myoglobin peptides generated in dry-cured ham. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.50, p.343–359, 2012.

PANCHAUD, A.; AFFOLTER, M.; KUSSMANN, M. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: how to analyze food bioactives and their health effects. **Journal of Proteomics**, Barking, v.75, p. 3546-3559, 2012.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, Barking, v. 166, n.2, p. 368-379, 1987.

SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 8, p. 1901-1906, 1989.

SENTANDREU, M.A.; TOLDRÁ, F. Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 2, p. 511-515, 2007.

SENTANDREU, M.A.; ARMENTEROS, M.; CALVETE, J.J.; OUALI, A.; ARISTOY, M.C.; TOLDRA, F. Proteomic identification of actin-derived oligopeptides in dry-cured ham. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 3613–3619, 2007.

SENTANDREU, M.A.; STOEVA, S.; ARISTOY, M.C.; LAIB, K.; VOELTER, W.; TOLDRÁ, F. Identification of small peptides generated in Spanish dry-cured ham. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, p. 64–79, 2003.

TALON, R.; LEROY, S.; LEBERT, I.; GIAMMARINARO, P.; CHACORNAC, J.P.; LATORRE-MORATALLA, M.L.; VIDAL-CAROU, M.C.; ZANARDI, E.; CONTER, M.; LEBECQUE, A. Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.126, p. 227–234, 2008.

VIGNOLO, G.; CUOZZO, S.; De KAIRUZ, M.N.; HOLGADO, A.P.R.; OLIVER, G. *Listeria monocytogenes* inhibition in meat slurry by in situ produced lactocin 705. **Microbiology Aliments Nutrition**, Canberra, v. 14, p. 363-367, 1996.

Anexo A - Tabela contendo os aminoácidos identificados nos BS em estudo nos tempos 0 e 3 dias, os resultados estão expressos em mg/100g

	0 dias de incubação					3 dias de incubação				
	BS Csp	BS-Lss 1862	Ems 35	BS Control	BS-Lps 681	BS Csp	BS-Lss 1862	Ems 35	BS Control	BS-Lps 681
Asp	8,06	1,90	1,69	3,06	8,05	18,25	17,58	6,00	3,02	20,13
Glu	10,05	9,69	7,66	7,68	9,06	39,96	52,61	18,83	7,74	39,78
Asn	6,87	3,79	4,24	4,00	6,44	23,12	19,63	13,89	4,57	26,93
Ser	22,43	7,90	6,97	12,27	22,24	13,29	27,33	19,83	11,28	8,02
His	84,62	83,34	90,89	89,93	79,77	70,00	48,90	107,20	80,48	89,12
Gln	12,02	0,00	2,04	4,72	12,38	19,34	15,99	11,94	6,31	15,10
Gly	16,31	12,47	11,77	14,42	15,62	27,69	26,90	18,07	11,38	29,35
Thr	6,06	3,79	3,36	3,78	5,81	13,71	12,82	11,31	4,04	10,45
Arg	15,09	8,64	5,60	7,32	13,71	20,83	5,29	2,10	10,52	29,83
Ala	22,02	19,55	19,34	20,35	21,16	38,15	45,63	32,49	18,75	36,26
GABA	2,50	0,00	4,36	3,64	1,98	5,23	0,00	1,81	0,00	9,48
Tyr	8,98	5,61	3,53	5,93	8,54	19,82	19,97	0,00	7,25	19,63
Val	8,43	5,91	5,77	6,28	8,01	26,17	34,76	22,66	7,42	23,42
Met	5,07	3,60	3,64	4,20	4,35	29,73	31,20	17,82	5,98	31,37
Trp	16,57	7,27	12,48	9,04	13,94	19,19	11,45	14,35	11,61	16,71
Phe	11,54	7,18	8,33	7,90	9,93	38,05	43,34	26,87	9,19	38,54
Ile	8,07	5,51	6,21	5,79	7,11	24,76	27,68	19,25	8,40	23,84
Leu	14,87	11,37	12,52	11,14	13,53	49,71	56,01	33,94	13,03	48,59
Orn	7,67	4,07	6,97	0,00	4,69	24,68	29,70	20,50	8,64	14,94
Lys	17,93	7,55	11,22	11,34	14,85	53,41	43,77	32,03	14,91	44,49

Acido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), histidina (His), glutamina (Gln), glicina (Gly), treonina (Thr), arginina (Arg), alanina (Ala), ácido gama-aminobutírico (GABA), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), triptofano (Trp), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), ornitina (Orn) e lisina (Lys)

Anexo B - Tabela contendo os aminoácidos identificados nos BS em estudo nos tempos 6 e 10 dias, os resultados estão expressos em mg/100g

	6 dias de incubação					10 dias de incubação				
	BS Csp	BS-Lss 1862	Ems 35	BS Control	BS-Lps 681	BS Csp	BS-Lss 1862	Ems 35	BS Control	BS-Lps 681
Asp	38,39	34,81	8,61	3,79	41,55	40,36	65,26	18,5	5,22	73,21
Glu	61,6	74,36	32,34	8,9	60,35	79,69	119,46	53,05	13,03	104,76
Asn	46,5	35,59	25,21	5,9	51,09	51,32	63,48	45,05	9,48	87,59
Ser	16,67	42,58	29,22	12,68	7,9	40,33	67,21	48,77	17,81	8,2
His	111,99	88,17	105,21	83,65	129,33	101,75	158,45	183,91	115,1	200,08
Gln	35,12	33,17	24,31	6,83	30,34	46,31	54,79	42,64	9,92	54,39
Gly	45,28	44,2	29,04	11,65	46,88	50,77	74,08	46,04	16,76	80,79
Thr	25,11	26,13	18,24	4,79	22,14	38,13	48,8	32,03	7,37	44,2
Arg	46,22	10,77	2,91	12,32	59,73	18,72	23,52	12,61	18,54	115,79
Ala	56,6	66,52	52,8	20,35	56,36	73,48	103,25	67,7	29,24	97,93
GABA	14,29	4,39	2,7	0	17,33	11,57	9,57	6,35	0	13,96
Tyr	37,09	34,45	0,94	9,01	36,73	53,07	58,47	3,37	13,88	67,9
Val	41,37	57,22	41,37	9,33	39,42	59,84	91,67	56,34	16,41	71,21
Met	53,61	51,72	34,04	8,01	54,92	66,44	83,11	58,2	15,28	89,47
Trp	20,55	16,5	16,26	11,76	19,63	26,53	26,8	24,25	12,43	29,16
Phe	63,85	65,07	42,93	12,98	64,13	82,56	99,57	63,66	20,58	103,09
Ile	42,56	40,64	32,72	9,44	40,78	62,83	70,33	55,36	14,71	72,82
Leu	87,08	86,21	59,73	14,9	82,42	120,37	138,87	98,78	22,06	133,57
Orn	33,96	50,9	34,86	3,28	14,86	76,63	91,11	66,12	0	0
Lys	70,59	78,1	53,29	17,18	56,83	116,89	164,1	119,09	23,48	110,49

Acido aspártico (Asp), ácido glutâmico (Glu), asparagina (Asn), serina (Ser), histidina (His), glutamina (Gln), glicina (Gly), treonina (Thr), arginina (Arg), alanina (Ala), ácido gama-aminobutírico (GABA), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), triptofano (Trp), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), leucina (Leu), ornitina (Orn) e lisina (Lys)

5 IMPACTOS DAS ALEGAÇÕES DE SAÚDE EM PRODUTOS FERMENTADOS COM BAIXO TEOR DE SÓDIO

Resumo

O primeiro contato entre consumidores e o produto alimentar é normalmente a embalagem e seu rótulo. Assim, ele é o principal meio para gerar expectativa sobre a aceitação. O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito das alegações de saúde sobre a aceitação de salame com reduzido conteúdo de sódio, visando encontrar os direcionadores da reformulação dos produtos em estudo onde 62 consumidores avaliaram as 4 amostras em estudo, 3 comerciais e um protótipo de laboratório com 63% de redução de sódio. O teste de aceitação foi conduzido usando uma escala hedônica de 9 pontos, posteriormente os atributos que afetaram a aceitação foram caracterizados mediante a escala do ideal de 7 pontos. O teste de expectativa foi realizado em três etapas numa única sessão. Na primeira etapa avaliaram as amostras codificadas com números aleatórios de 3 dígitos, na segunda etapa avaliaram a expectativa gerada pelas alegações de saúde, na terceira etapa avaliaram novamente as amostras juntamente com as alegações de saúde e, no caso da amostra reduzida em sódio, com o rótulo informativo. Os resultados mostraram que as alegações de saúde tiveram pouco efeito na aceitação dos consumidores decorrentes em valores de aceitação baixo para o protótipo de laboratório, é importante indicar que o atributo salgado não foi determinante na queda da aceitação e sim o sabor residual gerado pela adição de sais substitutos.

Palavras-chave: Teste de expectativa; Consumidores; Conteúdo reduzido de sódio

Abstract

The first contact between consumers and the food product is usually the packed product and its label. Therefore, it is the primary means to generate expectations about acceptance. The aim of this chapter is to evaluate the effect on health claims on acceptance of salami with reduced sodium content, aimed at finding ways of reformulating the product in study. Sixty-two consumers evaluated four samples of the product under study, three were commercial samples and the other was a laboratory prototype with 55% of sodium reduction. The acceptance test was conducted using a 9-point hedonic scale, and then the attributes that affected acceptance were characterized by the 7-point ideal scale of 7 points. The expectation test was carried out in three stages in a single session. In the first stage, samples coded with random numbers of three digits were evaluated. In the second stage, willingness expectation generated by health claims was assessed and in the third stage, samples and health claims were evaluated again. In the case of the low-sodium sample, with the information on the label, the results showed that health claims had little effect on consumer acceptance, resulting in lower acceptance values for the laboratory prototype. Attributes of salt were not decisive in decreased acceptance but it was relevant in the after taste generated by adding salt substitutes.

Keywords: Expectation test; Consumers; Reduced sodium content

5.1 Introdução

A produção de alimentos enfrenta diferentes desafios que vão desde satisfazer as necessidades nutricionais básicas das pessoas até cumprir as complexas exigências relacionadas à características sensoriais. Atualmente pesquisadores em ciência e tecnologia de produtos cárneos, têm focado parte de suas pesquisas no desenvolvimento de embutidos fermentados com níveis reduzidos de sódio e com boas características sensoriais. Os produtos cárneos fermentados convencionais possuem um alto valor agregado chegando a custar seis vezes mais que a carne *in natura* e são produtos bem aceitos pelos consumidores (TOLDRÁ, 1998). Porém, esses constituem em uma importante fonte de sódio, devido ao fato de durante sua elaboração, adicionar-se entre 1,5 e 3,0% de NaCl e ao final essa concentração pode atingir valores entre 2,5 e 5,0% (CICHOSKI et al., 2009). Deve-se observar que a ingestão de sódio recomendada na dieta diária é de 1,5 g, o que corresponde a 3,75 g de cloreto de sódio (TOLDRÁ, 2006; COZZOLINO, 2005). Assim, tem-se recomendado a redução na ingestão de NaCl devido a relação existente entre o nível elevado de sódio e a hipertensão arterial (COLMENERO, 2007).

Porém o desenvolvimento de produtos com baixo teor de sódio enfrenta a barreira da alteração do sabor provocada pela redução do NaCl e pelos *off flavors* provocados pela adição de substitutos. Isso ocorre pela alteração das características sensoriais dos produtos, não concordando com as características multi-sensoriais idealizadas pelo consumidores baseadas nas experiências anteriores (PIQUERAS-FISZMAN; JAEGER, 2014a)

Indiscutivelmente, a integração multi-sensorial, no consumo de um alimento pode estar em sua forma mais extrema, no caso de percepção de sabor, influenciada por outras experiências que oferecem a oportunidade para a estimulação dos principais sentidos (PIQUERAS-FISZMAN; JAEGER, 2014a). Porém o consumidor tem uma expectativa psicológica sobre o produto que está consumindo, isso remete a sua mente a sabores e odores associados a um bem estar ou a uma fase de sua vida.

Neste contexto, Piqueras-Fiszman e Jaeger (2014a) afirmam que, nossa percepção de um estímulo (neste caso um salame com teor reduzido de sódio), é afetada primeiramente por suas propriedades sensoriais

extrínsecas e intrínsecas, sendo as propriedades intrínsecas (o sabor, odor, textura, entre outros) muito importantes, desempenhando um papel fundamental na avaliação por parte dos consumidores. Porém, os alimentos, nunca são apresentados de forma isolada já que normalmente é apresentada aos consumidores embalado (como é disponível no supermercado). É importante considerar que outros elementos extrínsecos também podem gerar expectativa sobre as propriedades dos alimentos. A maior parte dos estudos sobre o impacto dos fatores extrínsecos é centrado nas expectativas evocadas pela informação contida na etiqueta da embalagem e na marca dos produtos embalados. Nesse sentido, a comunicação sobre as propriedades nutricionais e de saúde dos produtos, passam à ser muito importantes. Assim, a diferença entre as propriedades sensoriais, usando-se os sentidos através dos quais, os consumidores elegem se gostam ou não de um alimento. As alegações de saúde, são muitas vezes inatingíveis, uma vez que no geral o consumidor não pode saber o quanto saudável é um alimento somente pela aparência do produto e da embalagem (CARRILLO, 2011).

Por outro lado, já nas características intrínsecas, um dos métodos para se avaliar as características que influenciam na aceitação são as escalas JAR (Just-About-Right), que são usadas em pesquisas de mercado para identificar os atributos presentes em um alimento em um nível que vai desde muito abaixo do ideal até muito acima do ideal, tendo como seu ponto central o "ideal". Essa metodologia tem a vantagem de ter um componente analítico e outro afetivo, refletindo tanto a intensidade de um atributo, quanto o seu nível ideal, ou seja, o nível preferido para o atributo avaliado (ROTHMAN; PARKER, 2009). Segundo Popper (2014) e Moskowitz (2004) uma das limitações de usar esse tipo de escala, se diz respeito a não proporcionar o quanto se necessita mudar uma formulação para se atingir o nível ideal de um atributo em particular. Portanto, torna-se difícil pontuar a intensidade de um atributo, influenciando na aceitação global do mesmo. Segundo o exposto, o objetivo principal deste estudo foi, comparar um salame com baixo teor de sódio desenvolvido a nível de laboratório(protótipo) com quatro amostras comerciais, mensurando-se: (A) a expectativa gerada pelas alegações de saúde sobre o consumo de produtos com o baixo teor de sódio; (B) O impacto da redução do sódio sobre a aceitação do salame, usando as escalas JAR e a

análise de penalidade; (C) buscar direcionadores para uma melhoria na formulação em função da aceitação do consumidor.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Elaboração dos salames

Para a produção dos salames com baixo teor de sódio foi utilizado em sua formulação os seguintes ingredientes cárneos: paleta suína (60%), acém bovino (20%) e toucinho (20%); e os ingredientes não cárneos adicionados foram: nitrato de sódio (0,015%), nitrito de sódio (0,015%), eritorbato de sódio (1,0%), dextrose (0,75%) e especiarias (0,32%) com base em 100% de matéria-prima carne. Foram adicionados os micro-organismos *Enterococcus mundtii* CRL 35; *Staphylococcus vitulinus* GV 318 e *Lactobacillus sakei* CRL 1862 em concentração de 10^8 UFC/g. O processamento dos salames foi preparado de acordo com as seguintes etapas: primeiramente as carnes foram moídas, utilizando-se discos com furos de 10, 8 e 5 mm para as carnes suína, bovina e toucinho, respectivamente. O preparo da massa foi realizado em misturadeira marca Beccaro modelo MB – 25 serie 0010-2476 (Beccaro – Brasil) com o tempo de mistura de 5 minutos. A massa obtida foi embutida em tripa de colágeno reconstituído (35 cm de comprimento e 4,5 cm de diâmetro) Viscofan. Em seguida, foram submetidos à fermentação e a maturação/secagem.

Durante a fermentação, a temperatura foi de 21 a 23°C, com umidade relativa (UR) de 85 a 90%, essa condição foi mantida até atingir o pH entre 5,0 e 5,2 (medida realizada pelo pHmetro Oakton pH300 equipado com eletrodo de punção Digimed), posteriormente os salames foram secos e maturados a temperatura de 17 a 19°C, a 75% de UR por 20 a 25 dias, até atingir a atividade de água 0,90 (Aqualab CX2T a 25,0°C ± 0,3).

5.2.2 Determinação de sódio

Para verificar o teor de sódio no salame, foi realizada análise conforme a metodologia da AOAC (2005). Pesou-se de 5 a 10g de amostra diretamente na cápsula de porcelana, previamente aquecidos em mufla a 550°C, resfriados e pesados, anotando os pesos. A cápsula com a amostra foi carbonizada em chapa elétrica e depois calcinado em mufla à temperatura de

550°C e transformada em cinza de acordo com metodologia descrita 31.1.04 da AOAC (1995). Com as cápsulas frias, as cinzas foram dissolvidas com 2,5 mL de ácido nítrico P.A. e transferidas para um balão volumétrico de 50 mL. Foi feita uma amostra em branco como controle e a leitura realizada em um fotômetro de chama, 28 dias após o processamento do salame.

5.2.3 Análise da composição centesimal

A umidade foi determinada por diferença entre a matéria úmida e a matéria seca, realizada em estufa a 105°C, segundo metodologia 31.1.02 da AOAC da AOAC (1995). O teor de proteínas totais foi determinado de acordo com o método de Kjeldahl descrito pela metodologia 31.1.08 da AOAC (AOAC 1995), com o cálculo feito em base seca e posteriormente transformado em base úmida. A determinação de lipídeos foi realizada pelo método de Soxhlet, de acordo com a metodologia 31.4.02 da AOAC (1995) com os resultados expressos em porcentagem. Essas análises foram realizadas com 28 dias de processamento do salame.

5.2.4 Análise microbiológica

Vinte e cinco gramas de cada salame foram misturados com 225 mL de água peptonada estéril a 0.1% (Difco - Sparks/MD - USA) e homogeneizada por 8 minutos (Labblender 400, Seward medical, London, U.K.). Diluições decimais foram preparadas e inoculadas em duplicata em um meio seletivo apropriado para cada micro-organismo em questão. As seguintes condições foram usadas para os meios: Plate Count Agar e MRS ágar a temperatura de 30 °C durante 48 h para os micro-organismos mesófilos aeróbios e bactérias ácido lácticas respectivamente e Mannitol Salt Agar a 37°C por 48 h em CNS.

5.2.5 Testes sensoriais afetivos

Todos os consumidores que participaram nas análises afetivas foram recrutados nas imediações da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Todos os testes sensoriais foram executados nas cabines sensoriais individuais do

departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição LAN da ESALQ/USP implementadas com luz branca, circulação de ar e controle de temperatura.

5.2.6 Teste de expectativa

Com a finalidade de estudar o efeito da expectativa gerada por alegações de saúde dos novos produtos na aceitação dos mesmos foram realizados vários testes sensoriais afetivos. Inicialmente recrutou-se consumidores sob o critério que gostassem e consumissem esse tipo de produto pelo menos uma vez por mês. Participaram dos testes 62 consumidores, com idade entre 18 e 50 anos, do sexo masculino e feminino. Os testes sensoriais foram conduzidos em uma única sessão, dividido em três etapas e realizado conforme descrito a seguir:

Etapa 1 - Esta etapa foi denominada de teste convencional "Cego (C)", onde mede-se o grau de aceitação e a intenção de compra do salame, utilizando respectivamente uma escala hedônica estruturada de nove pontos (9 = gostei muitíssimo e 1 = desgostei muitíssimo) e uma escala de intenção de compra de nove pontos (1 = certamente não compraria e 9 = certamente compraria) de acordo com o descrito por Stone e Sidel (1993).

Etapa 2 - avaliou-se a expectativa gerada no consumidor a partir de informação sobre os benefícios de uma dieta com pouco sódio e as vantagens de se consumir um produto com teor reduzido do mesmo. Todas as informações mencionadas foram utilizadas na composição de um texto similar aos apresentados nos rótulos de produtos alimentícios comerciais. Para exaltar as características de saúde colocou-se no rótulo a inscrição "Salame com teor reduzido de sal" e "Elaborado com uma redução de 55% de sódio".

Os provadores avaliaram as informações das fichas e indicaram o quanto esperavam gostar da amostra, utilizando uma escala hedônica estruturada de nove pontos (9 = gostei muitíssimo e 1 = desgostei muitíssimo) e uma escala de intenção de compra de nove pontos (1 = certamente não compraria e 9 = certamente comprariam). Os dados obtidos nesta etapa do estudo correspondem à avaliação da expectativa (E).

Etapa 3 - Nesta ultima etapa do teste, os provadores receberam uma amostra de salame acompanhada do respectivo texto contendo as

informações sobre a redução do sódio e seus benefícios para a saúde do consumidor, avaliando-se, assim, o impacto destas informações com relação à aceitação do produto. Assim, nesta terceira etapa, os provadores foram solicitados a reler as informações sobre o salame, prová-los novamente e realizar sua avaliação utilizando a escala hedônica estruturada de nove pontos e a escala de intenção de compra de nove pontos. Os dados obtidos nesta etapa do estudo correspondem à avaliação real (R).

Para analisar a amostra de salame em relação à aceitação, em cada uma das três etapas - teste cego (C), avaliação da expectativa (E) e avaliação real (R) - foi realizada uma média com desvio padrão e na sequência foi realizado o teste t de Student, entre as médias do teste cego (C) e da avaliação real (R).

A expectativa do consumidor é modelada pela teoria da não confirmação da expectativa, onde a experiência esperada e experiência real, são diferentes (incongruência). Sendo assim, apresenta-se quatro teorias psicológicas para explicar o efeito da incongruência: (1) Assimilação, (2) Contraste, (3) negatividade generalizada e (4) Assimilação - contraste (PIQUERAS-FISZMAN; JAEGER, 2014b; BEHRENS et al., 2007).

As diferenças entre os escores individuais da avaliação real e avaliação cega (R - C), bem como a diferença entre os escores individuais da expectativa e da avaliação cega (E - C), foram plotados considerando que os valores (R - C) foram representados na ordenada e os valores (E - C) na abscissa do gráfico. Assim, os dados foram submetidos a uma análise de correlação linear simples de Pearson, obtendo-se a equação da reta, o coeficiente de correlação (r) e seu respectivo nível de significância.

Nesse sentido, se $E > C$, ocorre a não confirmação positiva da expectativa, e o consumidor considera o produto melhor que o esperado. Se $R > C$, então as alegações foram eficientes em melhorar a aceitação do produto pelo consumidor. Se $R < C$, pode-se concluir que as alegações apresentadas não estão contribuindo positivamente para aumentar a aceitação do produto (BEHRENS et al., 2007)

5.2.7 Teste com uso da escala JAR

Para esse estudo utilizou-se três marcas de salames tipo italiano comerciais, disponíveis no estado de São Paulo (Brasil), que foram comparadas com o salame com baixo teor de sódio produzido neste estudo. Foram recrutadas 60 consumidores com idades variando entre 21 e 60 anos, e os mesmos indicaram serem consumidores habituais de salame. Os consumidores foram colocados em cabines individuais e receberam as instruções do uso da escala e do tipo de avaliação sensorial que iriam realizar. As quatro amostras de salames foram servidas de forma monádica de acordo com a ordem de apresentação seguindo um delineamento experimental quadrado latino onde controla-se a ordem de apresentação e a sequência de provadores.

Os consumidores então foram convidados a experimentar o produto e avaliarem o quanto gostaram ou desgostaram do salame com respeito a qualidade global usando uma escala hedônica de nove pontos (1 = desgostei muitíssimo, 5= não gostei, nem desgostei, 9 = gostei muitíssimo) (MEILGAARD et al., 2006). Após os consumidores avaliaram a textura, sabor característico, cor e teor de sal usando a escalado ideal de 7 pontos (Just-About-Right - JAR) (7 = muito mais do que o ideal, 4= Ideal e 1= muito menos que o ideal) (POPPER, 2014). Este estudo encontra-se registrado e aprovado na Comissão de Ética e Pesquisa com seres Humanos da ESALQ/USP sob o protocolo 104/2012.

5.2.8 Análise estatística

As análises estatísticas das variáveis físico-químicas foram realizadas utilizando a ANOVA de uma via ($p < 0,05$). As respostas da aceitação foram analisadas utilizando ANOVA de três vias ($p < 0,05$), considerando as seguintes fontes de variação: amostra, provador e ordem de apresentação. Para avaliar as diferenças significativas sobre as características físico-químicas e de aceitação, utilizou-se o teste de diferença de médias de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises de ANOVA e Tukey foram realizadas no software Statistica 12 (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Os resultados da escala JAR foram analisados mediante análise de penalidade e

análise de componentes principais (ROTHAMAN; PARKER, 2009).utilizando o software XLSTAT (Addinsoft, New York, USA).

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Determinação do teor de sódio e composição centesimal

O teor de sódio no produto final desenvolvido nesta etapa da pesquisa, apresentou uma redução em torno de 60% quando se compara o salame desenvolvido (880 mg de sódio/100g) com os outros salames produzidos atualmente no mercado brasileiro. Entre as marcas comerciais mais consumidas de salame tipo italiano possuem níveis finais de sódio entre 1612 a 2562mg de sódio/100g

A A_w no processo final de produção do salames funciona como uma das principais barreiras contra os micro-organismos. O produto em desenvolvimento apresentou valor de atividade de água aceitáveis, já que a Instrução Normativa nº22, de 31 de Julho de 2000 define que este deve apresentar no máximo 0.90 (BRASIL, 2000). A A_w está intrinsecamente relacionada com o pH, assim conforme o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares (valores próximos a 5,4), paralelamente a água livre do produto diminui, fazendo com que o salame perca água com mais facilidade, devido à desidratação (TOLDRÁ et al., 2007).

Com relação a composição centesimal, o teor de umidade (35,2%) e de proteína (31,7%) encontram-se dentro da legislação brasileira, já que a Instrução Normativa nº22, de 31 de Julho de 2000 define que este deve apresentar no máximo 35% de umidade (BRASIL, 2000). Outro ponto que se deve analisar durante o desenvolvimento de um produto cárneo, é o teor de lipídeos, devido ao fato de este salame ser direcionado a um público em busca de um produto mais saudável. O produto em estudo apresentou teor de lipídeos de 28,9 % e está de acordo com a legislação, a qual preconiza máximo de 32% de gordura (BRASIL, 2000) e bem abaixo do encontrado na literatura para salames processados cujos valores estão em 31,9% (ZANARDI et al. 2004). Porém deve-se observar também, que a redução da gordura em salames é um assunto bem abordado, o que pode ser comprovado pelos vários estudos com valores de lipídeos próximos aos valores encontrados neste trabalho (MARANGONI, 2011; BARBOSA, 2009).

5.3.2 Análise microbiológica

Com o objetivo de monitorar a população inoculada no início do processamento e observar o crescimento desta durante toda a etapa de secagem e maturação, foi realizada a contagem microbiológica. A inoculação inicial foi dentro do previsto para esse estudo, sendo uma população entre 10^8 - 10^9 UFC/g para os *Enterococcus* e *Staphylococcus*, porém para as bactérias lácticas, a contagem foi um pouco abaixo do estimado (10^5 UFC/g). Após o período de fermentação, ocorreu crescimento ideal dessa bactéria láctica e a sua contagem atingiu valores entre 10^6 - 10^7 com 14 dias de produção do salame, mantendo-se com essa contagem até o final da maturação.

Figura 5.1 - Contagem de micro-organismos do salame com adição da cultura starter *Lactobacillus sakei* CRL1862 + *Enterococcus mundtii* CRL35 + *Staphylococcus vitulinus* GV318

Nossos resultados concordam com os reportados em outros estudos, assim, Rantsiou e Cocolin (2006) relataram após três dias de fermentação a contagem dos micro-organismos adicionados como cultura starter atingiu 7-8 log UFC/g, permanecendo relativamente sem grandes alterações em sua contagem até o final de sua produção. A população destas bactérias é de grande importância, pois produz ácido láctico e ácido acético que vão inibir o crescimento de bactérias patogênicas, especialmente *Staphylococcus aureus*. (GEISEN; LUCKE; KROCKEL, 1992; LUCKE, 2000).

Com relação ao *Staphylococcus vitulinus* a contagem inicial também foi a esperada e ocorreu crescimento dessa população durante os dias de secagem e maturação do salame. Isso possivelmente significa que a acidez produzida durante a fermentação, pouco interferiu no crescimento do *Staphylococcus vitulinus*. Assim pode-se inferir que a acidificação (pH 5,0) encontra-se em uma região não crítica para esse micro-organismo.

5.3.3 Testes sensoriais afetivos

Teste de expectativa

Com a finalidade de estudar o efeito da expectativa gerada pelas alegações de saúde, realizou-se três testes sensoriais afetivos e a resposta dos mesmos se encontram descritos na Tabela 5.1 com a média de aceitação do salame, em cada uma das três etapas de avaliação conduzida no presente projeto: teste cego (C); teste de expectativa (E) e teste real (R).

Na primeira etapa deste estudo (C), a amostra de salame com baixo teor de sódio obteve a aceitação média próxima a 7,0 referente a categoria entre "gostei ligeiramente" e "gostei moderadamente". Na sequência, os consumidores retornaram para realizar o teste de expectativa e lerem o seguinte texto: "Segundo a Organização Mundial da Saúde, o brasileiro consome três vezes mais cloreto de sódio (sal) que o recomendado. O alto consumo de sal e em consequência, alto consumo de sódio provoca sérios danos à saúde, como hipertensão sanguínea e acidente vascular cerebral. Dentre as inúmeras fontes de consumo de sal, estão os produtos industrializados e no caso dos produtos cárneos, pode se destacar o salame que possui em aproximadamente 5% de sal em sua composição. Assim nos últimos anos, estudos vêm sendo realizados para reduzir a quantidade de sódio nos alimentos. Nosso novo produto é um Salame tipo Italiano com baixo teor de sal, onde se conseguiu uma redução de 55% de sódio. Esta nova formulação é um produto saudável que pode ser consumido por crianças, adolescentes, adultos e também idosos". Após a leitura do texto os consumidores avaliaram a aceitação que eles consideram que esse salame tem, respondendo assim o teste "E" com uma pontuação média para aceitação de 7,8, e isso significa que os consumidores em média, consideraram ao produto entre "gostei moderadamente" a "gostei muito".

Tabela 5.1 -Médias de aceitação da amostra de Salame tipo Italiano com baixo teor de sódio (1 = desgostei muitíssimo; 5 = não gostei/nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo), obtidas nas três diferentes etapas de avaliação: Cega (C), expectativa (E) e Real (R)

Etapas de avaliação			Teste t	
Cega (C)	Expectativa (E)	Real (R)	Avaliação Cega x Real (R x C)	Nível de significância P
6,7	7,8	6,9	-0,96	0,34

Teste t: comparação entre as médias do teste cego (C) e da avaliação Real (R) de uma mesma amostra. Nível de significância $p \leq 0,05$

Entretanto, na ultima etapa do teste, quando os provadores reavaliaram as amostras após lerem novamente as informações sobre a mesma amostra (R), a pontuação média foi próxima de 7,0 indicando que os consumidores gostaram moderadamente da amostra.

Assim, a avaliação (R) demonstrou que as alegações descritas no texto não apresentaram efeito significativo ($p > 0,05$) no sentido de elevar a aceitação dos produtos em relação ao (C) e praticamente não contribuiu para gerar um efeito positivo em função da expectativa nos consumidores (Tabela 5.1). Essa resposta é provavelmente devida ao fato das alegações de saúde não diminuírem alteração das características sensoriais provocadas pelo processo de reformulação de redução de sódio. Esse comportamento já foi apresentado em outros estudos, onde as alegações não foram suficientes para diminuir o efeito das características sensoriais desagradáveis geradas (DELIZA et al., 2012).

Em função das respostas obtidas, pode-se concluir que as informações contidas no texto não “convenceram” o consumidor a mudar a sua percepção com relação ao salgado e no caso do salame com baixo teor de sódio, acredita-se que o rótulo deve conter uma informação contundente sobre os benefícios do consumo deste tipo de produto, de modo a forçar mais o consumidor a ignorar os sabores estranhos ou a falta de sabor salgado provocada pelo baixo conteúdo de sal. É prudente afirmar, também, que as características sensoriais do salame com reduzido teor de sódio apresentaram, necessariamente, características sensoriais modificadas quando comparadas com o salame idealizado pela experiência anterior armazenada pelo consumidor (BETINA PIQUERAS-FISZMAN; JAEGER,

2014). Nesse sentido, Tuorila e Cardello (2002) afirmaram que o efeito das alegações de saúde sobre a aceitação de um produto diminui com a presença de sabores diferentes e nesses casos as alegações de saúde passam a ter efeito positivo moderado na aceitação do produto. Outra variável diz respeito à frequência de consumo, e alguns autores citam que o consumo deste tipo de produto depende da qualidade sensorial e da necessidade de consumo frequente (BEHRENS et al., 2007).

Foram considerados 62 consumidores como um número válido nos testes, dado a natureza metodológica (teste de conceito mais teste de aceitação e escalas JAR com consumidores habituais de salame). A população testada não apresentou uma clara segmentação dos escores na aceitação (dados não publicados) mais as características próprias de cada consumidor influencia nas suas respostas, causando logicamente uma segmentação das mesmas (VARELA, 2014). Nesse contexto, deve-se observar que ao se trabalhar com as médias em testes afetivos pode-se perder algumas informações relevantes, devido ao fato de isso não expressar a opinião dos consumidores que gostaram do produto e por consequência deram notas altas e dos consumidores que desgostaram e derem notas baixas (BEHRENS et al., 1999).

Figura 5.2 - Representação gráfica dos efeitos individuais da expectativa sobre a aceitação real do salame com baixo teor de sódio (C= Teste cego, E= Teste de expectativa, R= teste real)

Assim na Figura 5.2, encontram-se no quadrante 1, 38,3% dos consumidores acharam o produto pior que o esperado, ou seja, o valor de E foi maior que o C ($E > C$), causando uma assimilação da informação, aumentando assim a aceitação final em relação ao teste cego inicial ($R > C$). No quadrante 2, verificou-se que 0% dos consumidores acharam a amostra de salame melhor que o esperado ($E < C$), ocorrendo um aumento da aceitação final ($R > C$), demonstrando que as alegações geraram expectativas positivas. No terceiro quadrante, 8,3% dos consumidores acharam o salame melhor que o esperado ($E < C$). Entretanto, no julgamento final, as alegações influenciam no sentido de diminuir a aceitação do produto ($R < C$). No quarto e último quadrante, 8,3% dos consumidores acharam o produto pior que o esperado ($E > C$), ocorrendo uma diminuição da aceitação em relação ao teste cego inicial ($R < C$), podendo-se dizer que neste ultimo quadrante, as alegações conseguiram gerar uma expectativa positiva.

Assim, neste estudo, pode-se afirmar que as alegações propostas no rótulo e no texto conseguiram influenciar somente um terço dos consumidores, aumentando de forma não significativa a aceitação, por outro lado, a informação neste estudo não foi suficiente de modo a alterar positivamente a percepção do consumidor. Esses resultados, concluem que além do uso de alegações de saúde no rótulo do produto, deve-se tomar cuidado com a drástica alteração provocada de redução do sabor salgado e conseqüente alteração do sabor característico do salame.

Teste afetivo com uso da escala do ideal (Just-About-Right – JAR)

Nesta parte da pesquisa, utilizou-se uma escala hedônica de 9 pontos para medir a aceitação global do consumidor e uma escala do ideal (Just-About-Right, JAR) de 7 pontos para medir se os atributos relacionados à cor, maciez, sabor característico e teor de sal nos salames, estão acima, abaixo ou no ponto ideal com relação à preferência dos consumidores.

Para melhor visualização e discussão dos resultados, graficou-se as respostas JAR em três grupos apresentados na Figura 5.3. Sendo que o

primeiro grupo está composto pelas pontuações 1, 2 e 3 e representam as respostas que estão “abaixo do ideal”. O segundo grupo está formado pela pontuação 4 que representa “o ideal” e o terceiro grupo está formado pelas pontuações 5, 6 e 7 que representam as respostas “acima do ideal”.

Assim, é possível observar nesta figura que a porcentagem de consumidores para o atributo cor da amostra 580 (salame com baixo teor de sódio do estudo), desenvolvida no laboratório, apresentou valores acima do ideal relacionado com a cor, significando que os consumidores consideraram esse produto mais escuro. Pode-se dizer que isso influencia diretamente na aceitação dos consumidores, pois estes desejam um salame com uma intensidade de cor não muito escura. Quando comparado com as amostras comerciais, o tratamentos 428 (salame comercial com 2562mg de sódio/100g de amostra) e 635 (salame comercial com 1612mg de sódio/100g) apresentaram porcentagens mais elevadas que o ponto ideal para todos os atributos. Essas respostas eram esperadas devido a que esses produtos são os mais consumidos no mercado brasileiro. Por outro lado, a amostra 372 (salame comercial com 1790mg de sódio/100g) apresentou porcentagem elevada no ponto ideal para os atributos de textura (maciez) e teor de sal.

Com relação ao atributo teor de sal, a amostra desenvolvida nesta pesquisa (580) apresentou valores elevados tanto para “abaixo do ideal” quanto para “ideal”. O fato de ter uma proporção elevada de consumidores que perceberam a amostra como ideal é favorável para o intuito desta pesquisa, já que uma elevada proporção de consumidores não perceberam a substituição de NaCl pela combinação de 0,25% cloreto de potássio + 0,25% de cloreto de cálcio. Lamentavelmente o fato de não ter influenciado na percepção do teor de sal do salame não implicou que os outros atributos sensoriais não sejam influenciados, assim a textura e o sabor característico do salame foram percebidos abaixo do ideal por uma elevada porcentagem de consumidores. Percebe-se também que o atributo sabor característico foi percebido como acima ou abaixo do ideal, indicando que este atributo foi percebido fora do ideal por uma elevada porcentagem de consumidores.

As amostras 635 e 428 foram percebidas como próximas ao ideal para textura, sabor característico e teor de sal, ditas amostras apresentaram uma aceitabilidade maior o que era esperado.

Figura 5.3 - Porcentagem das respostas das escalas JAR agrupadas em 3 níveis. Abaixo do ideal; ideal e acima do ideal para os atributos de cor, maciez, sabor característico e teor de sal, (n=60). Salame 580 - salame com baixo teor de sódio do estudo; Salame 635 - salame comercial com 1612mg de sódio/100g; Salame 428 - salame comercial com 2562mg de sódio/100g; Salame 372 - salame comercial com 1790mg de sódio/100g

Para as amostras 372 e 580, a porcentagem de consumidores que perceberam como próximas ao ideal foi baixo, assim a aceitação do consumidor foi também baixa, o que indicaria uma possível rejeição do produto quando ele estiver no mercado. A alta rejeição pelas amostras antes descritas é devida aos atributos textura e sabor característico antes mencionados. Para o tratamento com reduzido teor de sódio (580), a rejeição deve-se a textura "mole" provocada pela redução do cloreto de sódio ou pelo sabor amargo, ácido em excesso e metálico provocado pela substituição do cloreto de sódio pela combinação de cloreto de potássio e cloreto de cálcio. Este comportamento já foi reportado na literatura por Nascimento et al. (2007). Uma vez que a textura e o sabor característico têm importância para os

consumidores, sendo muito importante o efeito destes atributos na aceitação. Assim, para uma melhor análise dos atributos que modificariam a preferência do consumidor realizou-se uma análise de penalidade sobre os valores de aceitabilidade descrito a seguir (AGUDELO et al., 2015).

A análise de penalidade (Penalty Analysis) verificou a influência dos atributos medidos usando escalas JAR sobre a aceitação e assim pode-se identificar potenciais direções para a reformulação do salame. Segundo Agudelo et al. (2015), a análise de penalidade ajuda a identificar as possíveis melhoras sensoriais no produto, identificando os atributos mais próximos ao ideal, aumentando assim sua aceitação. Dessa forma, foram utilizados os dados de aceitação que expressam a satisfação global do consumidor em relação aos produtos; e aqueles obtidos pela escala JAR relacionadas com a cor, textura (maciez), sabor característico e teor de sal, que indicam o quão ideal um produto está em relação ao esperado pelo provador.

Então, de modo a melhorar o potencial do produto, deve-se focar à atenção nos atributos contidos na parte superior direita de cada uma das amostras, apresentados na Figura 5.5. Esses atributos são considerados susceptíveis de modificação quando pelo menos 20% dos consumidores informarem esses encontram-se acima ou abaixo do ideal (XIONG;MEULLENET, 2006). Segundo Popper (2014), para uma escala hedônica de 9 pontos, uma queda maior a 1.0 é considerada como o limiar que representa uma queda significativa, porém uma queda menor do que 1.0 é considerada insignificante.

Segundo a Figura 5.4, a amostra 580, desenvolvida no laboratório apresentou baixa aceitabilidade com média de 5,4 e foi semelhante a amostra comercial codificada como 372. Por outro lado, as amostras codificadas como 428 e 635 obtiveram médias acima de 6,0. Neste caso pode-se concluir que a amostra desenvolvida e a amostra 372 foram similares, mesmo esta ultima ter uma elevada quantidade de sal.

Figura 5.4 - Aceitação dos tratamentos usando uma escala hedônica de 9 pontos Salame 580 - salame com baixo teor de sódio do estudo; Salame 635 - salame comercial com 1612mg de sódio/100g de amostra; Salame 428 - salame comercial com 2562mg de sódio/100g de amostra; Salame 372 - salame comercial com 1790mg de sódio/100g de amostra

Nesse sentido, na Figura 5.5, observa-se que os atributos que penalizaram por mais de 1,0 ponto por 20% de consumidores foram atributos relacionados ao sabor característico (abaixo e acima do ideal) e o teor de sal abaixo do ideal, sendo que os atributos que se encontram na parte superior direita representam um maior impacto na queda da aceitabilidade. Ao comparar-se a amostra 580 com as demais amostras usadas neste estudo, observou-se que no caso da amostra 372, os atributos penalizados acima do ideal foram textura, cor e sabor característico e abaixo do ideal, sabor característicos. Assim os atributos penalizados e diferentes de nossa amostra foram a cor e a textura acima do ideal. Pode-se supor que algum "*off flavor*" presente em nossa amostra foi muito intenso, a ponto de diminuir a penalidade dos outros atributos. As amostras 428 e 635 apresentaram poucos atributos penalizados, explicando-se assim a maior aceitação pelos consumidores.

Deve-se observar também, que os atributos citados no parágrafo anterior referente a amostra 580, devem ser modificados para aumentar a aceitação do produto. Porém, esse comportamento era esperado já que a substituição do NaCl, por combinação de (0,25%) cloreto de potássio + (0,25%) de cloreto de cálcio produz um sabor residual amargo, ácido e metálico no salame (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005). Assim a

recomendação para a reformulação sensorial desta amostra em função da aceitação sensorial é a seguinte: aumentar o sabor característico, aumentar a percepção do sabor salgado. Pode-se concluir também, que a análise de penalidade neste estudo ajudou a identificar possíveis direcionadores para a reformulação do salame com baixo teor de sódio, demonstrando a importância deste estudo para o desenvolvimento de novos produtos.

Figura 5.5 - Representação da análise de penalidade das amostras sobre a queda da aceitabilidade (escala hedônica de 9 pontos) Vs. porcentagem de consumidores. O ponto de corte foi o 20% dos consumidores que indicaram que um atributo era abaixo (-) ou acima (+) do ideal, (n=60). Salame 580 - salame com baixo teor de sódio do estudo; Salame 635 - salame comercial com 1612mg de sódio/100g; Salame 428 - salame comercial com 2562mg de sódio/100g; Salame 372 - salame comercial com 1790mg de sódio/100g

Na Figura 5.6 se apresenta os biplots gerados na Análise de Componentes Principais (ACP) baseada na correlação de Pearson, que indica

a relação entre os atributos JAR e as amostras (ROTHAMAN; PARKER, 2009). Para essa análise, a variância explicada pelos 2 componentes principais foi de 99%, indicando que houve pouca perda de informação a respeito das variáveis reais. Pode-se perceber que os atributos textura, teor de sal e sabor característico estão relacionados ao componente principal 1, em quanto que a qualidade global e a cor estão correlacionadas com o componente principal 2.

Figura 5.6 - Análise de componentes principais dos dados JAR para os 4 tratamentos. Salame 580 - salame com baixo teor de sódio do estudo; Salame 635 - salame comercial com 1612mg de sódio/100g; Salame 428 - salame comercial com 2562mg de sódio/100g; Salame 372 - salame comercial com 1790mg de sódio/100g

Assim o componente principal 1 diferenciou as amostras 580 e 428 das amostras 372 e 635 em função dos atributos correlacionados com esse componente. Possivelmente isso se deve a que as amostras 635 e 372 foram percebidas no ponto ideal ou acima do ideal, porém as amostras 420 e 580 foram percebidas como abaixo do ideal, os motivos deste comportamento corrobora os resultados obtidos na análise de penalidade que já foi explicado detalhadamente no texto. Com relação ao componente principal 2, as amostras 428 e 635 foram diferentes das amostras 580 e 372, devido aos

atributos qualidade global e cor já que esses atributos estavam correlacionados com esse componente principal. É interessante observar que os dois componentes separam de diferente forma cada par de amostras, obviamente devido a que cada um deles representa a diferentes atributos sensoriais. Portanto, o componente principal 2 agrupou as amostras da mesma forma que a aceitação, indicando que a mesma é influenciada diretamente pela qualidade global, significando que esse atributo contempla todos os demais atributos de uma holística.

5.4 Conclusão

A alegação no rótulo teve pouca influencia no aumento da aceitação do produto pelo consumidor. No contexto proposto para este estudo, o salame desenvolvido foi pouco aceito segundo a escala estruturada de 9 pontos. A escala JAR demonstrou ser uma ferramenta adequada para o desenvolvimento de produtos e junto com a análise de penalidade indicaram que o principal direcionador da preferência foi o sabor característico. O salame tradicionalmente é consumido como um produto com alto teor de sal, assim dever-se-á procurar reduções menos drásticas de sal, de modo a preservar o sabor característico deste tipo de produto. Com relação ao sabor salgado, deve-se buscar outras estratégias para não produzir sabores estranhos.

Referências

- AGUDELO, A.; VARELA, P.; FISZMAN, S. Methods for a deeper understanding of the sensory perception of fruit fillings. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 46, n. 0, p. 160-171, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 16th ed. Arlington, 1995. 2200p.
- BARBOSA, R.G. **Fabricação de salame tipo Hamburguês com substituição parcial de sódio**. 2009. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BEHRENS, J.H. **Avaliação do perfil sensorial e aceitação de vinhos brancos varietais risling, gewürztraminer e chadonnay produzidos no Brasil**. 1998. 157p. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

BEHRENS, J.H.; HEINEMANN, R.J.B.; MARQUEZ, U.M.L. Parboiled rice: A study about attitude, consumer liking and consumption in São Paulo, Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 87, p. 992-999, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade de Qualidade de Salames. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 ago. 2000. p. 15-28.

CARRILLO, E.; VARELA, P.; FISZMAN, S. Influence of nutritional knowledge on the use and interpretation of Spanish nutritional food labels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 71, p. H1-H8, 2011.

CICHOSKI, A.J.; ZIS, L.C.; FRANCESCHETTO, C. Características físico-químicas e microbiológicas da superfície do salame tipo italiano contendo solução de lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v. 29, n.3, p. 546-552, 2009.

COZZOLINO, S.M.F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 2005. 878 p.

DELIZA, R.; MACFIE, H.; HEDDERLEY, D. Use of computer generated images and conjoint analysis to investigate sensory expectations. **Journal of Sensory Studies**, Westport, v.18, p. 465-486, 2002

GEISEN, R.; LÜCKE, F.K.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. **Fleisch Wirtschaft International**, Frankfurt am Main, v. 72, n. 6, p. 894-898, 1992.

JIMENEZ-COLMENERO, F. Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods: technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 18, n. 11, p. 567-578, 2007.

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

MARANGONI, C.; MOURA, N.F. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum sativum* L. in Italian salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 124-128, 2011.

MEILGAARD, M.C.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 464p.

MOSKOWITZ, H.R. **Product testing and sensory evaluation of foods.** Westport: Foods & Nutrition Press, 1983. 605p.

PIQUERAS-FISZMAN, B.; JAEGER, S.R. Emotion responses under evoked consumption contexts: a focus on the consumers frequency of product consumption and the stability of responses. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 35, p. 24-31, 2014a.

_____. The impact of evoked consumption contexts and appropriateness on emotion responses. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 32, p. 277-288, 2014b.

POPPER, R. Use of just-about-right scales in consumer research. In: VARELA, P.; ARES, G. (Ed.). **Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling.** Boca Raton: CRC Press; Taylor & Francis, 2014. p. 137-155.

RANTSIOU, K.; COCOLIN, L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 255-267, 2006.

ROTHAMAN, L.; PARKER, M.J. **Just-About-Right (JAR) scales:** design, usage, benefits and risks. West Conshohocken: ASTM International Standards Worldwide, 2009. 172 p.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products: review. **Meat Science**, Barking, v. 70, p. 531–541, 2005.

STONE, H.S.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices.** San Diego: Academic Press, 1993. 308p.

TOLDRÁ, F. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. **Meat Science**, Barking, v. 49, n. 1, p. 101-110, 1998.

_____. The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 17, n. 4, p. 164-168, 2006.

TUORILA, H.; CARDELLO, A.V. Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 13, p. 561-590, 2002.

VARELA, P. Application of multivariate statistical methods during new product development. Case study: application of principal component analysis and hierarchical cluster analysis on consumer liking data of orange juices. In: GRANATO D.; ARES, G. **Mathematical and statistical methods in food science and technology.** Chichester: John Wiley, 2014. chap. 11, p. 187-200.

XIONG, R.; MEULLENET, J.-F. A PLS dummy variable approach to assess the impact of jar attributes on liking. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 17, n. 3/4, p. 188-198, 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**, Barking, v. 66, p. 415-423, 2004.

6 CONCLUSÃO GERAL

Este estudo permitiu elaborar salames tipo Italiano com altas reduções de NaCl, com bons índices de aceitação pelos consumidores. A baixa adição de cloretos substitutos mostrou aceitação sensorial mais próxima do produto comercial. Outro ponto de grande interesse relatado neste estudo foi a possibilidade de se produzir salames com apenas 1,0% de NaCl, sem a adição de cloretos substitutos.

Com relação a oxidação lipídica dos produtos fermentados com baixo teor de NaCl, observa-se que a redução do NaCl e adição de cloretos substitutos produziu alterações sobre a lipólise, proteólise e degradação de Strecker e pode-se concluir a existência de uma relação entre a concentração de aldeídos e as médias de aceitação sensorial. Essa relação, nas condições deste trabalho, poderá ser utilizada para orientar a escolha da concentração dos cloretos substitutos que minimiza os efeitos adversos da redução do NaCl sobre a qualidade sensorial do salame.

A capacidade peptidogênica das quatro cepas de LAB em combinação com o *Staphylococcus vitulinus* foi demonstrada em um modelo BS com baixo teor de sódio através de uma abordagem peptidômica. Perfis exclusivos de peptideos com baixo peso molecular provenientes das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas foram produzidos em cada modelo contendo diferentes LAB. Assim a utilização de concentrações mais baixas de sódio para o preparo de salames poderia ter um efeito positivo adicional com relação a produção de peptideos relacionados ao sabor. Porém deve-se avaliar o quanto seria benéfico esses peptideos para o desenvolvimento de aroma nestes produtos

Sobre as alegações de saúde contidas no rótulo, a mesma teve pouca influência no aumento da aceitação do produto pelo consumidor. A escala JAR demonstrou ser uma ferramenta adequada para o desenvolvimento de produtos e junto com a análise de penalidade, pode indicar um direcionador para o desenvolvimento de novos produtos

Deve-se ressaltar que o salame tradicionalmente é consumido como um produto com alto teor de sal, assim dever-se-á procurar reduções menos drásticas de sal, de modo a preservar o sabor característico deste tipo

de produto, buscando se outras estratégias de modo à não produzir sabores estranhos.