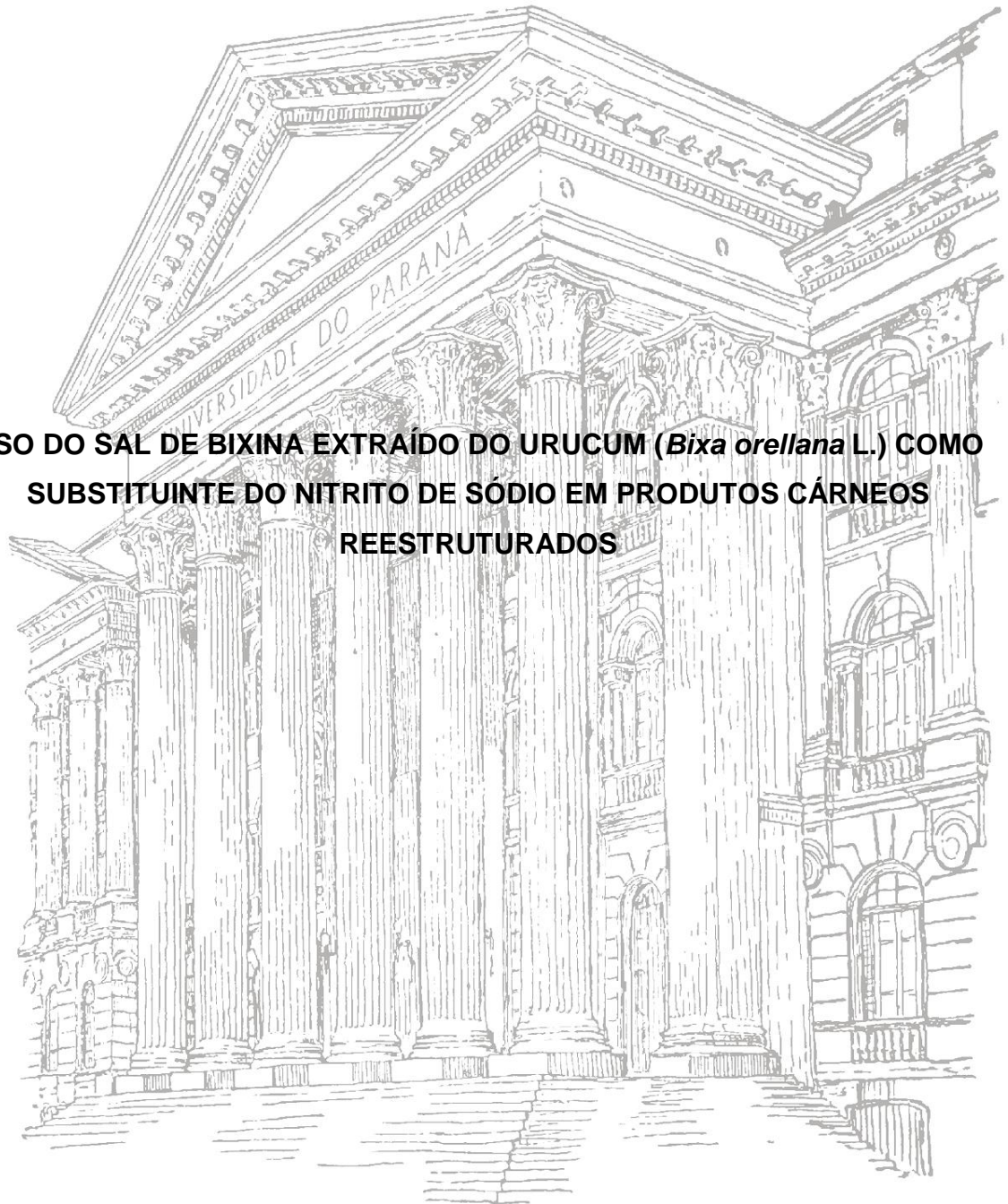


SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO

**USO DO SAL DE BIXINA EXTRAÍDO DO URUCUM (*Bixa orellana* L.) COMO  
SUBSTITUINTE DO NITRITO DE SÓDIO EM PRODUTOS CÂRNEOS  
REESTRUTURADOS**



CURITIBA  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO

**USO DO SAL DE BIXINA EXTRAÍDO DO URUCUM (*Bixa orellana* L.) COMO  
SUBSTITUINTE DO NITRITO DE SÓDIO EM PRODUTOS CÁRNEOS  
REESTRUTURADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Mara Woranovicz Barreira  
Co-orientadores: Prof.Dr.Carlos Eduardo Rocha Garcia  
Prof.Dr.Obdúlio Gomes Miguel

CURITIBA  
2014

Golin Pacheco, Samanta Daliana

Uso do sal de bixina extraído do urucum (*Bixa orellana L.*) como substituinte do nitrito de sódio em produtos cárneos reestruturados / Samanta Daliana Golin Pacheco – Curitiba, 2014.

128 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Sandra Mara Woranovicz Barreira

Coorientador: Professor Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia

Coorientador: Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Carne. 2. Carotenoides. 3. Cor. 4. Hambúrguer. 5. Oxidação sensorial.  
I. Barreira, Sandra Mara Woranovicz. II. Garcia, Carlos Eduardo Rocha.  
III. Miguel, Obdúlio Gomes. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 664.9

## **TERMO DE APROVAÇÃO**


**SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO**

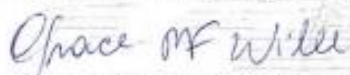
**Título: "USO DO SAL DE BIXINA EXTRAÍDO DO URUCUM  
(*Bixa orellana* L.) COMO SUBSTITUINTE DO NITRITO DE  
SÓDIO EM PRODUTOS CÂRNEOS REESTRUTURADOS"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Mara Woranovicz Barreira  
Orientadora

  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia  
Co-orientador

  
Prof. Dr. Marcus Vinicius de Liz  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Grace Maria Ferreira de Castro Wille  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 02 de junho de 2014.

*Aos meus amados pais*

*Modesto Golin e Divanir Dalla Costa,*

*e irmãos Marco, Thiago e Sara*

*À toda família e amigos que deram*

*suporte para estar onde estou*

*Carlos Gustavo, meu esposo, amigo e amor.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, benção e proteção.

À Universidade Federal do Paraná, por propiciar meios para frequentar o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Aos meus orientadores, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Mara Woranovicz Barreira, Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia e Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel pela orientação e estímulo para a realização deste trabalho que, com compreensão e carinho, participaram na elaboração e execução do projeto.

Aos professores coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Prof. Dr. Roberto Pontarolo e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilis Dalarmi Miguel, por toda a dedicação e incentivo prestado ao programa e aos pós-graduandos.

Ao laboratório de Tecnologia em Alimentos do Departamento de Farmácia, e as professoras Grace Maria de Castro Wille e Patrícia Teixeira Padilha da Silva pelo apoio e incentivo em todos os momentos; a técnica Wandelice Gurski Chiampi pela amizade e incentivo.

Ao laboratório e professores de Fitoquímica Tomoe Nakashima e Vítor Alberto Kerber.

Ao professor de toxicologia Ricardo Wagner por sua disposição e auxílio com as análises de nitrito.

Ao laboratório de Engenharia de Alimentos da UFPR, em especial à professora Maria Lúcia Masson pela disponibilização de equipamentos essenciais ao trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup> Wanda Moskalewski Abrahão e aos servidores e colegas do Laboratório Central do Estado – LACEN, do setor de Microbiologia de Alimentos.

Ao Departamento de Química por disponibilizar os aparelhos de Infra-vermelho e Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Museu Botânico Municipal de Curitiba, especialmente à sua diretora, Clarisse Poliquesi, Juarez Cordeiro e Osmar dos Santos Ribas pelo apoio para realização deste trabalho.

Ao IAPAR de Morretes – PR pelo acolhimento e disponibilização para coleta do urucum, em especial ao Sr. Luiz Adão Ferreira da Silva pelo suporte para coleta.

Ao professor Geraldo Pichet e ao doutorando Waldemar Volanski do laboratório de bioquímica pela amizade e auxílio nas horas de dúvidas com estatística.

Ao estatístico professor Dr. Anselmo Chaves Neto, pela contribuição no tratamento de dados estatístico.

A Capes e CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos farmacêuticos: Giovanna Chippon Strapasson, Daniele Santos, Camila Vandresen Vinícius Bednarczuk de Oliveira, Paulo Roberto do Rego Monteiro de Carvalho, Vinícius José Bolognesi e Fernanda O' Campos pela expressiva colaboração na realização da parte prática e companheirismo na caminhada.

Aos auxiliar técnico Vitor Vlnieska do laboratório de microbiologia por ajuda na elucidação do infravermelho.

Ao secretário Jean Godoi por seu auxílio e dedicação com o Programa de Pós-graduação.

Ao meu marido Carlos Gustavo Pacheco por seu amor, carinho, incentivo irrestrito.

Agradeço de forma especial ao Prof. Dr. Vicente Pacheco pelo incentivo de ingressar no mestrado.

A todos os amigos que, embora não citados nominalmente, foram importantes para realização deste trabalho.

Enfim, a todos os que direta e indiretamente ou ainda anonimamente colaboraram na execução desta jornada e tornaram viáveis todos os passos para a realização do curso.

“Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

- Carta para Robert Hooke (15 de Fevereiro de 1676)

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."

- *Em 1687, Explicando a sua Terceira Lei de Newton - Ação e Reação*

Isaac Newton (\* 4 de janeiro de 1643 - † 31 de março de 1727,  
pelo calendário gregoriano).



## RESUMO

O nitrito de sódio é um aditivo de múltiplas funções tecnológicas na indústria cárnea. No entanto, em razão da crescente preocupação quanto à sua toxicidade, diversos estudos buscam alternativas para reduzir seu uso. O urucum (*Bixa orellana* L.) é um vegetal fonte de carotenoides, como bixina e norbixina, amplamente utilizado como corante alimentício. Este trabalho teve como objetivo avaliar o sal de bixina extraído do urucum como substituinte do nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em produtos cárneos reestruturados. As peças cárneas foram elaboradas utilizando como matéria prima cortes comerciais de patinho bovino (*Vastus lateralis*), caracterizadas quanto à composição química, congeladas a  $-16^\circ\text{C}$  e avaliadas, na forma crua ou grelhada, por até 60 dias. O sal de bixina foi obtido a partir de sementes de urucum submetidas a gradiente de extração de crescente polaridade provida por solventes orgânicos (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol). Os cristais de bixina obtidos (5,1% de rendimento) foram saponificados utilizando hidróxido de potássio (KOH) resultando em um sal. A substituição do  $\text{NaNO}_2$  foi avaliada nas seguintes condições: NIT (150:0); BIXNIT (250:75); BIX (500:0) e CTRL (0:0). O efeito da substituição do  $\text{NaNO}_2$  pelo sal de bixina foi avaliado quanto às concentrações residuais de nitritos, níveis de TBARS, cor (componentes  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), teste sensorial de preferência e parâmetros microbiológicos. Os níveis residuais de nitrito sofreram redução acima 35% e 60%, ao término do processo e após 7 dias de armazenamento, respectivamente, e não foram mais passíveis de detecção em análises realizadas após o 30º dia. O  $\text{NaNO}_2$  proporcionou o maior efeito antioxidante, porém, o sal de bixina durante o período de armazenamento reduziu a oxidação aproximadamente entre 60% e 30% nos tratamentos BIXNIT e BIX, respectivamente, durante o armazenamento. O sal de bixina promoveu cor vermelha ( $a^*$ ) e amarela ( $b^*$ ) e essas foram estáveis durante o período de análises (60 dias) nas amostras avaliadas cruas ou congeladas. Após 60 dias de armazenamento, a aceitação visual das amostras cruas NIT (45) foi inferior ao CTRL (82) e superadas por BIX (83) e BIXNIT (80); de forma geral, este comportamento se repetiu durante o período avaliado e também no produto grelhado. Nas condições avaliadas não foi verificada significativa ação antimicrobiana nos tratamentos com nitrito ou contendo bixina. O uso do sal de bixina se mostrou uma alternativa viável para prover cor e ação antioxidante nos produtos cárneos reestruturados em substituição total e parcial ao nitrito de sódio.

Palavras-chave: carne; carotenoides; cor; hambúrguer; oxidação, sensorial.

## ABSTRACT

Sodium nitrite is an additive with multiple technology function in the meat industry. However, due to the increasing concern about its toxicity, many studies seek alternatives to reduce its use. Annatto (*Bixa orellana* L.) is a natural source of carotenoids such as bixin and norbixin, widely used as food coloring. This study aimed to evaluate the salt extracted from annatto bixin as a substitute for sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) in restructured meat products. Meat pieces were prepared using raw retail cuts of beef Duckling (*Vastus lateralis*), chemical composition characterized, frozen at  $-16^\circ\text{C}$  and evaluated raw or grilled for up to 60 days. The salt of bixin was obtained from annatto seeds subjected to extraction gradient of increasing polarity provided by organic solvents (hexane: chloroform: ethyl acetate: ethanol). The bixin crystals obtained (5.1% yield) were saponified using potassium hydroxide (KOH) resulting in a salt. Substitution of  $\text{NaNO}_2$  was evaluated under the following conditions NIT (150:0); BIXNIT (250:75); BIX (500:0) e CTRL (0:0). The effect of replacing  $\text{NaNO}_2$  with bixin salt was evaluated through residual concentrations of nitrite, TBARS, color (L components\*,  $a^*$  and  $b^*$ ), sensory preference test and microbiological parameters. Residual nitrite levels were reduced above 35% and 60% at the conclusion of the process and after seven days of storage, respectively. There were no detection on nitrite levels after the 30th day.  $\text{NaNO}_2$  showed the highest antioxidant effect; however, bixin salt reduced oxidation between approximately 60% and 30% in BIXNIT and BIX treatments, respectively, during storage. The salt of bixin promoted red ( $a^*$ ) and yellow coloring ( $b^*$ ) which were stable during the tests (60 days) measured in both fresh and frozen samples. After 60 days of storage, the visual acceptability of raw samples NIT (45) was lower than the CTRL (82) less than BIX (83) and BIXNIT (80); in general, this behavior was repeated during the study period and also with the grilled product. This study showed no significant antimicrobial activity in treatments with nitrite or containing bixin. The use of bixin salt proved to be a viable alternative to provide color and antioxidant activity in restructured meat products to replace sodium nitrite.

Key words: meat, carotenoids, colour, hamburger, oxidation, sensory analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO.....	6
FIGURA 2 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DO LICOPENO, $\beta$ -CAROTENO E LUTEÍNA. .....	10
FIGURA 3 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GERAIS DA FAMÍLIA BIXACEAE. ....	12
FIGURA 4 - ESTRUTURA DA BIXINA E DA NORBIXINA. ....	13
FIGURA 5 - REAÇÃO ENTRE CAROTENÓIDE E OXIGÊNIO SINGLETE.....	15
FIGURA 6 - IDENTIFICAÇÃO REALIZADA NO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA-PR, BRASIL.....	21
FIGURA 7 - EXSICATA DE <i>BIXA ORELLANA</i> L. DEPOSITADA JUNTO AO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA-PR, BRASIL.....	22
FIGURA 8 - PROCEDIMENTOS PARA DETECÇÃO DE <i>Salmonella spp.</i> .....	30
FIGURA 9 - TUBOS DE TSI E LIA CARACTERÍSTICOS E AGAR SS PARA ISOLAMENTO DOS GÊNEROS <i>Salmonella</i> E <i>Shigella</i> . ....	32
FIGURA 10 - REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO .....	33
FIGURA 11 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A TÉCNICA DE NMP DE COLIFORMES A 35 E 45°C .....	33
FIGURA 12 - TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA.....	34
FIGURA 13 - EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE <i>Clostridium perfringens</i> POR GRAMA DE PRODUTO. ....	38
FIGURA 14 - TÉCNICA DE CONTAGEM DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM PROFUNDIDADE.....	38
FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS BIXINA (1), SAL DE BIXINA (2) .....	45
FIGURA 16 - ESPECTRO ULTRAVIOLETA DA BIXINA.....	46
FIGURA 17 – ESPECTRO ULTRAVIOLETA DO SAL DE BIXINA.....	47

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FORMULAÇÕES DAS AMOSTRAS DE REESTRUTURADOS .....	24
TABELA 2 - DESLOCAMENTO QUÍMICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ DO CRISTAL DE BIXINA E CORRELAÇÃO HMQC .....	44
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA PRIMA E PRODUTO REESTRUTURADO .....	48
TABELA 4 - NITRITO RESIDUAL NAS AMOSTRAS CÁRNEAS REESTRUTURADAS FORMULADAS COM SAL DE BIXINA.....	50
TABELA 5 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRODUTO REESTRUTURADO “CRU” .....	52
TABELA 6 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A LUMINOSIDADE ( $L^*$ ) EM CARNES REESTRUTURADAS “CRUAS” .....	54
TABELA 7 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A LUMINOSIDADE ( $L^*$ ) EM CARNES REESTRUTURADAS “GRELHADAS” .....	54
TABELA 8 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A COR VERMELHA ( $a^*$ ) EM CARNES REESTRUTURADAS “CRUAS” .....	56
TABELA 9- EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A COR VERMELHA ( $a^*$ ) EM CARNES REESTRUTURADAS “GRELHADAS” .....	57
TABELA 10 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A COR AMARELA ( $b^*$ ) EM CARNES REESTRUTURADAS “CRUAS” .....	57

TABELA 11 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A COR AMARELA (b*) EM CARNES REESTRUTURADAS “GRELHADAS” .....	58
TABELA 12 - PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES PELA COR DE PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS “CRUS” COM SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA .....	60
TABELA 13 - PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES PELA COR DE PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS “GRELHADOS” COM SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA .....	60
TABELA 14 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO EM PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS CRUS ARMAZENADOS “TEMPO 0” APÓS PROCESSAMENTO .....	62
TABELA 15 – EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO EM PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS CRUS ARMAZENADOS POR 30 DIAS.....	64
TABELA 16 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO EM PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS CRUS ARMAZENADOS POR 60 DIAS.....	64

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	–	Graus Celsius
C	–	Carbono
cm	–	Centímetro
cP	–	Centi Poise
g	–	Gramma
H	–	Hidrogênio
Hz	–	Hertz
M	–	Molar
mg	–	Miligrama
MHz	–	Megahertz
min	–	Minutos
mL	–	Mililitros
mm	–	Milímetro
nm	–	Nanômetros
®	–	Marca registrada
$\lambda$	–	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	–	Comprimento de onda máximo
$\mu\text{g}$	–	Microgramas
$\mu\text{L}$	–	Microlitro
$\mu\text{m}$	–	Micrômetro
$\mu\text{M}$	–	Micromols
T	–	Tensão de cisalhamento
ABIEC	-	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
Abs	–	Absorbância
Agar HE	-	Agar Hectoen
Agar SS	-	Agar <i>Salmonella-Shigella</i>
Agar XLD	-	Agar xilose lisina desoxicolato
AGE	–	Ácido Graxo Essencial
AGS	–	Ácido Graxo Saturado
AGMI	–	Ácido Graxo Monoinsaturado
AGPI	–	Ácido Graxo Poliinsaturado
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	–	Butil hidroxianisol

BHT	–	Butil hidroxitolueno
$\text{CDCl}_3$	–	Clorofórmio deuterado
CG-EM	–	Cromatografia gasosa associada ao espectrômetro de massa
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
DP	-	Desvio padrão
EMBRAPA	–	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EROs	–	Espécies reativas de oxigênio
ERMO	–	Espécies reativas do metabolismo do oxigênio
FAO	–	<i>Food and Agriculture Organization</i>
IAP	–	Instituto Ambiental do Paraná
IBGE	–	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IV	–	Infravermelho
LACEN	–	Laboratório Central do Estado do Paraná
LACOMA	–	Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos
LANARA	–	Laboratório Nacional de Referência Animal
LIA	-	Agar lisina ferro
MS	–	Ministério da Saúde
Mb	–	Mioglobina
$\text{NaNO}_2$	–	Nitrito de sódio
NO	–	Óxido nítrico
NOMb	–	Nitrosomioglobina
MMb	–	Metamioglobina
NMP	–	Número Mais Provável
RDC	–	Resolução da diretoria colegiada
RMN	–	Ressonância Magnética Nuclear
TBARS	–	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TSI	-	Agar tríplice açúcar ferro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVOS .....	3
1.1.1 Objetivo geral .....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
2.1 INDÚSTRIA CÁRNEA .....	4
2.2 PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS.....	4
2.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRODUTOS CÁRNEOS .....	6
2.4 ANTIOXIDANTES.....	7
2.5 USO DO NITRITO COMO AGENTE ANTIOXIDANTE E CONSERVANTE EM PRODUTOS CÁRNEOS .....	9
2.6 CAROTENOIDES.....	10
2.7 CAROTENOIDES EXTRAÍDOS DO URUCUM ( <i>Bixa orellana</i> L.) .....	11
2.7.1 Ação antioxidante dos carotenoides.....	14
2.8 COR DOS PRODUTOS CARNEOS CURADOS .....	16
2.9 CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM PRODUTOS CÁRNEOS .....	18
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	21
3.2 OBTENÇÃO DA BIXINA E SAL DE BIXINA.....	22
3.2.1 Identificação da bixina .....	23
3.2.2 Síntese do sal de bixina e análise por CLAE.....	24
3.3 PREPARO DOS PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS.....	24
3.3.1 Composição Físico-Química da Matéria-Prima e Produto Reestruturado .....	25
3.3.2 Umidade .....	25
3.3.3 Proteínas .....	26
3.3.4 Lipídios .....	26
3.3.5 Determinação de resíduo mineral fixo .....	26
3.3.6 Determinação do pH.....	26
3.3.7 Determinação da concentração residual de nitritos.....	27
3.4 EFEITO DO SAL DE BIXINA SOBRE A COR DOS PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS .....	27
3.5 OXIDAÇÃO LIPÍDICA – TESTE DO ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO.....	28



3.6 ANÁLISE SENSORIAL.....	29
3.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	29
3.7.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	30
3.7.1.1 <i>Confirmação bioquímica de Salmonella</i> spp. ....	31
3.7.1.2 <i>Confirmação sorológica de Salmonella</i> spp. ....	32
3.7.2. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes.....	33
3.7.3 Contagem de estafilococos coagulase positiva.....	34
3.7.4 Métodos de análise de Clostrídios sulfito redutores a 46°C.....	35
3.7.4.1 <i>Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina</i> .....	36
3.7.4.2 <i>Teste de redução do nitrato e teste de motilidade</i> .....	37
3.7.4.3 <i>Expressão dos resultados</i> .....	37
3.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	39
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
4.1 OBTENÇÃO DE BIXINA.....	40
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA BIXINA E SAL DE BIXINA.....	40
4.2.1 Síntese do sal de bixina e identificação por CLAE.....	45
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA CÁRNEA REESTRUTURADA.....	47
4.4 CONCENTRAÇÃO RESIDUAL DE NITRITO NOS PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS.....	49
4.5 OXIDAÇÃO LIPÍDICA – TESTE DE TBARS.....	51
4.6 AVALIAÇÃO DA COR.....	53
4.6.1 Efeito da substituição de nitrito por sal de bixina sobre a cor em produtos reestruturados.....	53
4.7 ANÁLISE SENSORIAL VISUAL.....	59
4.7.1 Testes de ordenação de preferência.....	59
4.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	61
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O processamento da carne origina-se em tempos pré-históricos. Possivelmente, os primeiros processos utilizados foram a desidratação provida pelo sol, salga e defumação. Dentre os processos tradicionais para conservação das carnes destacam-se a cura, expressão que remete à conservação de um produto por adição de sal, nitratos e/ou nitritos e outros coadjuvantes, como açúcar e antioxidantes (SKIBISTED, 1992; ROÇA, 2000; GARCIA *et al.*, 2002). A cura das carnes é um procedimento que tem por finalidade conservar a carne por um período de tempo maior, além de lhe conferir qualidades sensoriais como sabor e aroma agradáveis e coloração vermelha ou rósea atraente (ROÇA, 1981; YOUSSEF *et al.*, 2003; YOUSSEF *et al.*, 2011).

A rancidez, ou oxidação de lipídios, é a principal deterioração que acompanha os produtos cárneos, limitando a vida útil do produto à medida que gera produtos tóxicos e indesejáveis do ponto de vista sensorial, destrói vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais (GRAY, 1978).

Quando adicionado a carnes curadas o nitrito tem funções de inibir a oxidação lipídica e o desenvolvimento de bactérias dos alimentos, especialmente *Clostridium botulinum*, um micro-organismo esporulado que pode se desenvolver sob condições anaeróbicas e produzir uma neurotoxina letal aos seres vivos (WOODS, 1990). O nitrito, somado ao cozimento e a adição de sais, é uma proteção contra a intoxicação alimentar por esse micro-organismo (PIERSON, 1982).

O nitrito é um aditivo essencial em carnes curadas e após ser reduzido óxido nítrico (NO), interage com a mioglobina (Mb) e resulta na nitrosomioglobina (NOMb), um pigmento de cor vermelha característica dos produtos curados. Quando aquecido, o pigmento NOMb é convertido a nitroso-hemocromo, que possui a cor rósea característica de produtos curados e cozidos. A adição de um agente redutor, por exemplo, o ácido ascórbico, favorece o desenvolvimento da coloração desejada. Os pigmentos nitrosomioglobina (vermelho) e nitroso-hemocromo (rosado) são sensíveis à luz e à oxidação (PRICE; SCHWEIGERT, 1971; SHALABY, 1996; MITACEK *et al.*, 1999).

O uso de aditivos com a intenção de tornar os alimentos visualmente mais atraentes, seja na indústria alimentícia ou no uso doméstico cotidiano, é bastante comum (ARAÚJO, 1999). Conservantes e corantes estão cada vez mais presentes nos alimentos industrializados. Os produtos naturais têm apresentado uma demanda crescente não apenas no segmento de alimentos como também na indústria de cosméticos. Muitos são os corantes, antioxidantes e óleos essenciais hoje utilizados nesse nicho de mercado (OLIVEIRA, 2005). A substituição parcial do nitrito por antioxidantes naturais pode ser sugerida como uma prática tecnológica viável do ponto de vista sanitário e sensorial, relativo à cor da carne (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; BENEDETTI *et al.*, 2011).

O corante bixina extraído do pericarpo das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.), um arbusto nativo do Brasil e de outras regiões tropicais do planeta, é utilizado em várias partes do mundo, por conferir coloração vermelho-alaranjada atraente a uma extensa gama de produtos manufaturados (MERCADANTE *et al.*, 1996; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A Organização Mundial da Saúde reconhece sua toxicidade como negligenciável tanto para o consumo humano como para sua aplicação na pele. Encontram-se na literatura informações relacionadas ao emprego na medicina, como composto adstringente, bactericida, agente antioxidante eficaz no combate aos radicais livres, ou ainda para controle de taxas de colesterol e redução dos níveis de triglicérides no sangue (OLIVEIRA, 2005; GOLIN *et al.*, 2013a).

Embora a atividade antioxidante dos carotenoides do urucum tenha sido observada em diversas avaliações, a ANVISA, por meio da Portaria nº 1004 de 11 de novembro de 1998, reconhece seu extrato como um corante que pode ser utilizado em concentrações de até 0,002 g/100 g de produtos cárneos, não sendo permitido o uso deste aditivo em carnes frescas ou congeladas (BRASIL, 1998).

Desta forma, este trabalho avalia o urucum como antioxidante natural e promotor da coloração vermelha em substituição ao nitrito nos produtos cárneos reestruturados.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

– Investigar o uso do sal de bixina extraído do urucum como possível substituinte do nitrito de sódio em produtos cárneos reestruturados.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Obter sal de bixina com grau de pureza compatível ao uso alimentício;
- Investigar a capacidade do sal de bixina substituir o efeito corante do nitrito de sódio em produtos cárneos;
- Mensurar o efeito antioxidante do sal de bixina em comparação ao nitrito de sódio nos derivados cárneos reestruturados;
- Analisar o efeito antimicrobiano do sal de bixina nestes produtos;
- Analisar o efeito do sal de bixina sobre a aceitação sensorial dos produtos cárneos reestruturados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INDÚSTRIA CÁRNEA

Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, as carnes são os tecidos comestíveis dos animais de açougue, englobando músculos, com ou sem base óssea, gorduras e vísceras, podendo os mesmos ser *in natura* ou processados (EMBRAPA, 2002). Carne de açougue são as massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária, e submetidos à mudança (RIISPOA, 1952).

De forma complementar, produto cárneo é toda carne na qual as propriedades originais da matéria prima tenham sido alteradas por um ou mais dos seguintes procedimentos: moagem, floculação ou emulsão, adição de temperos, adição de agentes da cura ou tratamento térmico (BRASIL, 2003).

A produção e consumo de carne ainda é um porto seguro que garante a renda dos produtores no país (ABIEC, 2013). Em 2012 o consumo per capita foi de 47 quilos de carne de frango por ano, 35 quilos de bovina e 15 quilos de suínos. O abate de bovinos no Brasil alcançou recorde pelo segundo ano consecutivo, com 34,4 milhões de cabeças abatidas em 2013. O resultado é 10,6% superior ao desempenho do ano anterior, quando foram abatidas 31,1 milhões de cabeças (IBGE, 2013).

### 2.2 PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS

Os produtos reestruturados semi-prontos para o consumo como almôndegas, kibes, hambúrgueres, nuggets, apresentam-se como alternativa para o mercado. Para o consumidor, estes produtos são uma opção diante da crescente necessidade de minimizar o tempo de preparo dos alimentos, principalmente para a população dos grandes centros urbanos (BORBA *et al.*, 2013). Neste contexto, os

produtos cárneos reestruturados já fazem parte da rotina alimentar dos brasileiros, em virtude de suas características sensoriais, facilidade de preparo e elevado teor de lipídios, proteínas, vitaminas e minerais (QUEIROZ *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2009).

Os produtos e preparações à base de carne bovina moída ao menos os principais, apresentam regulamentações específicas e com limites impostos à composições diferenciadas. As almôndegas, por exemplo, devem apresentar teor de gordura máxima 18%, proteína bruta mínima 12%, carboidratos 10 %, e teor de cálcio máximo base seca 0,1%. Para hambúrgueres, o teor de gordura máxima é 23%, proteína mínimo 15%, carboidratos totais 3%, e teor de cálcio máximo base seca 0,1% (BRASIL, 2000).

Conforme a legislação específica (BRASIL, 2000), hambúrguer é um produto cárneo industrializado, obtido da carne moída dos animais de açougue, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido a processo tecnológico adequado. Tem como ingrediente obrigatório carne e como ingredientes opcionais gordura animal ou vegetal, água, sal, proteínas de origem animal e/ou vegetal, leite em pó, açúcares, maltodextrina, aditivos intencionais, condimentos, aromas e especiarias, vegetais, queijos e outros recheios. O limite máximo de adição de carne mecanicamente separada é 30%, exclusivamente em hambúrguer cozido, e de no máximo 4% de proteína não cárnea na forma agregada.

O consumo desses tipos de alimentos industrializados tem aumentado de maneira vertiginosa: uma única rede de “fast food” comercializa anualmente mais de 100 bilhões de hambúrgueres no mundo, numa taxa de 75 hambúrgueres por segundo (SPENCER; FRANK; MCINTOSH, 2005; BORBA *et al.*, 2013). A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) previram que o hambúrguer será uma das preparações mais difundidas no mundo até 2020, superando a pizza (CAYE *et al.*, 2009; BORBA *et al.*, 2013). Atualmente, com a crescente industrialização de produtos cárneos, o hambúrguer é uma alternativa para o aproveitamento de carnes menos nobres (COSTA, 2004; BORBA *et al.*, 2013).

## 2.3 OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRODUTOS CÁRNEOS

Os lipídios são importantes componentes dos produtos cárneos, conferindo características sensoriais desejáveis. Por outro lado, são facilmente oxidáveis, levando à rancidez por meio do desenvolvimento de substâncias indesejáveis, o que compromete a validade e qualidade do produto final. Os lipídios dos produtos cárneos são constituídos de uma mistura de mono, di e triacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e outras substâncias lipossolúveis. Desses, os ácidos graxos insaturados são aqueles suscetíveis ao processo oxidativo. Estima-se que o ácido linoléico (18:2) seja de 10 a 40 vezes mais suscetível à oxidação que o ácido oléico (18:1) (RAHARJO; SOFOS, 1993; GOMES *et al.*, 2003; FENNEMA, 2010; SERAFINI, 2013).

A oxidação lipídica pode ser acelerada pelo processamento da carne, em operações como corte e cozimento, os quais rompem as membranas do músculo, facilitando a interação dos ácidos graxos insaturados com substâncias pró-oxidantes. O ferro e os demais metais de transição presentes na composição da mioglobina podem reagir com radicais livres formando o radical hidroxil, que provoca danos em proteínas, ácidos nucleicos e retira o hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados (RAHARJO; SOFOS, 1993; FENNEMA, 2010). O processo de auto-oxidação lipídica pode ser resumido nas seguintes etapas (FIGURA 1):

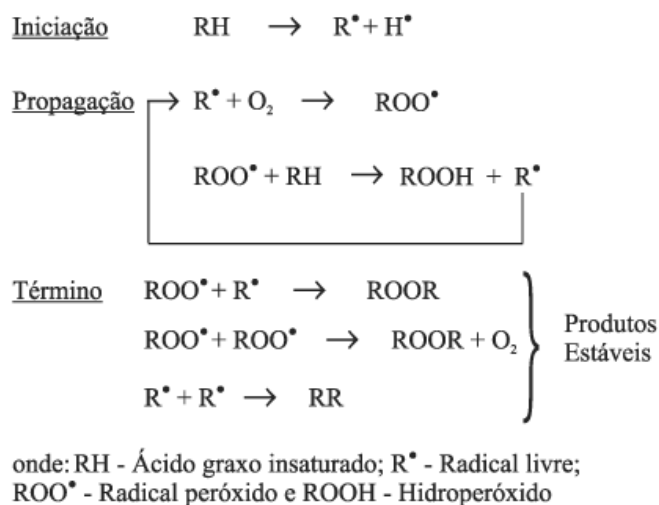


FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DO MECANISMO DE OXIDAÇÃO  
FONTE: FARMER (1942)

A autoxidação dos lipídios está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas:

- Iniciação – ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico da molécula, em condições favorecidas por luz e calor.
- Propagação – os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos). Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, onde ocorre um processo autocatalítico.
- Término – dois radicais livres interagem resultando formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis).

Para evitar a oxidação em produtos cárneos há a necessidade de diminuir a incidência dos fatores que a favorecem como minimizar os níveis de energia (temperatura e luz) responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres. Outra estratégia seria evitar a presença de traços de metais, prejudicando o contato com oxigênio e bloquear a formação de radicais livres por meio da utilização de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídios (BEKHIT *et al.*, 2003; RAMALHO; JORGE, 2006; BAÑÓN *et al.*, 2007).

## 2.4 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, e atuam por meio de dois mecanismos. O primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; já o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990; SIMIC; JAVANOVIC, 1994; SOARES, 2002).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, secundários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e mistos. Os



primários são compostos de ação antioxidante capazes de inibir ou retardar a oxidação por inativação de radicais livres graças à doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, transformando os radicais em substâncias estáveis. Os denominados secundários apresentam uma grande variedade de modos de ação, como: quelação de íons metálicos (alteração de valência); inativação de Espécies Reativas ao Oxigênio (ERRO), conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicalares ou absorção de radiação UV (BAILEY, 1996; MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

Antioxidantes fenólicos funcionam como estabilizadores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático demonstrada por estas substâncias (NAWAR, 1985). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica; entretanto, poucos são permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente à sua toxicidade (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; SOARES, 2002).

Na indústria de alimentos, a oxidação lipídica é inibida por sequestradores de radicais livres. Neste caso, os compostos mais utilizados, entre outros, são: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), tércio-butil-hidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxi-butilfenona (THBP), propil galato (PG), e, dentre os conservantes utilizados em produtos cárneos, encontra-se o nitrito. Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de estes antioxidantes apresentarem algum efeito tóxico. As organizações e comitês internacionais têm alterado nos últimos anos a ingestão diária aceitável (IDA) destas substâncias como resultado de pesquisas científicas (SKOG, JOHANSSON; JAÈ GERSTA, 1998; SOARES, 2002; AUN *et al.*, 2011; ALBUQUERQUE *et al.*, 2012).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, com o intuito de substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles para diminuir sua quantidade nos alimentos (WÜRTZE, 1990; SOARES, 2002; GARCIA *et al.*, 2012; GOLIN *et al.*, 2013).

## 2.5 USO DO NITRITO COMO AGENTE ANTIOXIDANTE E CONSERVANTE EM PRODUTOS CÁRNEOS

Originalmente utilizado no processo de cura como um conservante inibindo o desenvolvimento do *Clostridium botulinum*, o nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), além dos desejáveis efeitos sobre a coloração e aroma, proporciona aos produtos cárneos curados maior estabilidade oxidativa (CASSENS, 1995). Vários mecanismos têm sido propostos para esclarecer a capacidade antioxidante deste composto. Segundo Honikel (2007), os nitritos podem formar complexos com a mioglobina, evitando que os íons de ferro presentes nestas moléculas possam atuar como catalisadores da rancidez. Os nitritos poderiam também estabilizar os lipídios das membranas, que são rompidas durante os processos de cozimento ou moagem. Sua atividade antioxidante também poderia ser esclarecida em razão de sua capacidade quelante e redutora da ação catalítica dos metais pró-oxidativos.

O óxido nítrico (NO), formado a partir das reações do nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), possui a capacidade de reagir com a mioglobina (Mb) ou oximioglobina ( $\text{MbO}_2$ ) presente nos produtos cárneos levando à formação de nitrosomioglobina. Ao sofrer desnaturação, essa molécula passa a permanecer irreversivelmente no estado de nitrosohemocromo conferindo coloração avermelhada estável ao produto (SCANLAN, 1973; OHSHIMA; BARTSCH, 1981; SKIBISTED, 1992).

Existe uma estreita relação entre o estado de valência do ferro e os níveis de rancidez. O ferro na forma  $\text{Fe}^{3+}$  foi encontrado na metamioglobina (MMb), pigmento predominante nas formas mais oxidadas do charque, enquanto  $\text{Fe}^{2+}$  foi o estado de valência predominante nas amostras menos oxidadas e que continham nitrito em sua composição (YOUSSEF *et al.*, 2003). A utilização de  $\text{NaNO}_2$  em carnes de peru salgada e cozida mostrou a capacidade de promover a formação de desejável coloração avermelhada e prolongar a estabilidade oxidativa do produto (WALSH *et al.*, 1998).

No entanto, o  $\text{NaNO}_2$  pode reagir com aminas secundárias, terciárias ou compostos contendo grupamentos amino para formar as nitrosaminas, compostos tóxicos reconhecidamente mutagênicos. Neste contexto, existe o crescente interesse em minimizar a ingestão de nitrito. As Agências reguladoras, pesquisadores e indústrias têm trabalhado para reduzir os níveis dos sais de cura a concentrações

mínimas nos alimentos, suficientes para evitar a ocorrência de botulismo sem a perda do controle oxidativo. O emprego de substâncias bloqueadoras da reação de nitrosação como os ascorbatos e os tocoferóis, também têm sido utilizados em alguns países como instrumentos eficazes na inibição da formação das nitrosaminas (SCANLAN, 1973; OHSHIMA; BARTSCH, 1981; CASSENS, 1997).

## 2.6 CAROTENOIDES

Carotenoides são tetraterpenóides com 40 átomos de carbonos (FIGURA 2) que se caracterizam por apresentarem amplo espectro de cores, partindo do amarelo, passando por laranja, vermelho, e alcançando o púrpura (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; OLIVEIRA, 2005).

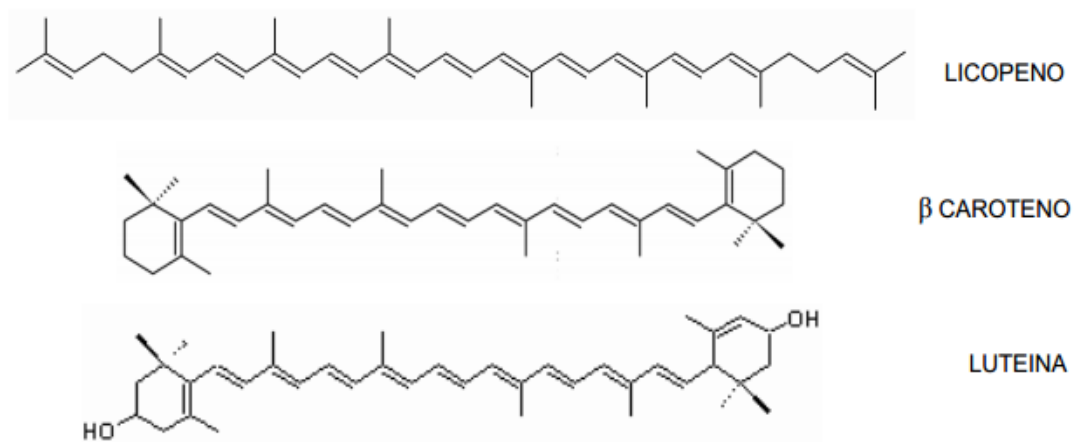


FIGURA 2 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DO LICOPENO,  $\beta$ -CAROTENO E LUTEÍNA.  
FONTE: RODRIGUEZ-AMAYA (2001); OLIVEIRA (2005)

O elemento fundamental da estrutura dos carotenoides é uma grande cadeia de oito unidades de isopreno, que pode permanecer linear (como por exemplo na estrutura do licopeno) ou então ciclizar-se em uma ou ambas as extremidades ( $\beta$ -caroteno). Geralmente são hidrocarbonetos, mas por oxidação podem originar as xantofilas, como, por exemplo, a luteína (BRUNETON, 1991; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Os carotenoides acumulam-se nos cloroplastos de todas as plantas verdes como uma mistura de alfa ( $\alpha$ ) e  $\beta$ -carotenos,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina, violaxantina e neoxantina, estando complexados de forma não covalente a proteínas. Os carotenoides também se encontram em micro-organismos, nos quais são sintetizados pela rota metabólica dos isoprenóides. Aproximadamente 80 carotenoides diferentes são sintetizados por bactérias fotossintéticas e alguns fungos filamentosos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; MALDONADO *et al.*, 2003). As funções dos carotenoides na fotossíntese são as de pigmentos para absorção de luz e fotoprotetores contra danos oxidativos (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPES, 2000).

Existem outros carotenoides com menos de 40 átomos de carbono, como é o caso da bixina, uma estrutura oxigenada com 24 carbonos na cadeia central (p. 13) (COSTA, 1975; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; OLIVEIRA, 2005).

## 2.7 CAROTENOIDES EXTRAÍDOS DO URUCUM (*Bixa orellana* L.)

A espécie *Bixa orellana* L., pertencente à família Bixaceae, conhecida popularmente como urucum, *leansstrauch* (alemão), *achiote* ou *onoto* (espanhol), *roçou* (francês) e *achiote* ou *annatto* (inglês), produz sementes utilizadas como matéria-prima para produção de um corante alimentício natural (ELIAS *et al.*, 2002; COSTA 2007; GARCIA *et al.*, 2012). Estatísticas demonstram que a América Latina é o principal produtor mundial de urucum, com uma produção anual de aproximadamente 17 mil toneladas, das quais 12 mil são originárias no Brasil (COSTA, 2007; EPAMIG, 2008; GARCIA, 2012).

A bixina é o principal pigmento, correspondendo a mais de 80% dos carotenoides totais encontrados no urucum (SATYANARAYANA; PRABHAKARA RAO; RAO, 2003; OLIVEIRA, 2005; COSTA, 2007; GOLIN *et al.*, 2013). A semente de urucum apresenta um pericarpo rico em bixina (metil hidrogênio 9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato), que é um diapocarotenóide (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>) com configuração cis, solúvel em solventes orgânicos e sendo o pigmento predominante nas sementes, nas preparações comerciais lipossolúveis de urucum e em colorífico

(BARBER *et al.*, 1961; PRESTON; RICKARD, 1980; KELLY 1996; MERCADANTE; STECK; PFANDER, 1997; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RIOS; MERCADANTE, 2004; OLIVEIRA, 2005; COSTA, 2007).

A norbixina (9-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato), encontrada em pequena quantidade nas sementes, é o pigmento principal das preparações hidrossolúveis e pode ser obtida pela saponificação da bixina em meio alcalino. Este pigmento também é um diapocarotenóide com configuração *cis* (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>), porém solúvel em solventes polares (KELLY, 1996; MERCADANTE; STECK; PFANDER, 1997; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RIOS; MERCADANTE, 2004; OLIVEIRA, 2005).

Em razão da intensidade das cores e da estabilidade frente às condições de processamento, os pigmentos da *B. orellana* são empregados como condimentos e corantes de alimentos e bebidas; derivados lácteos, cárneos e produtos de confeitaria (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; GARCIA *et al.*, 2012; GOLIN *et al.*, 2013). As características morfológicas gerais da família Bixaceae estão representadas na figura 3.



FIGURA 3 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GERAIS DA FAMÍLIA BIXACEAE.

FONTE: JOLY (1987).

NOTA: 1. Aspecto geral de ramo florífero; 2. Flor cortada longitudinalmente; 3. Antera vista de frente; 4. Antera (porção terminal do estame) vista por trás; 5. Detalhe do gineceu; 6. Corte transversal ao ovário; 7. Frutos; 8. Fruto cortado longitudinalmente; 9. Diagrama floral de *Bixa orellana* L.

A bixina faz parte do grupo de compostos denominados apocarotenoides, também chamado de norisoprenos. Este grupo é gerado por uma clivagem oxidativa nas moléculas de carotenoides (tetraterpenoide de 40 carbonos) entre as posições C9 e C10, que responde, em média, por 2,5% do peso das sementes secas de *B. orellana*. Removendo-se o grupo metil éster da bixina, obtém-se a norbixina, um ácido dicarboxílico (EVANS, 1992; OLIVEIRA, 2005; OSÓRIO, 2010). As estruturas químicas destes corantes estão representadas na figura 4.

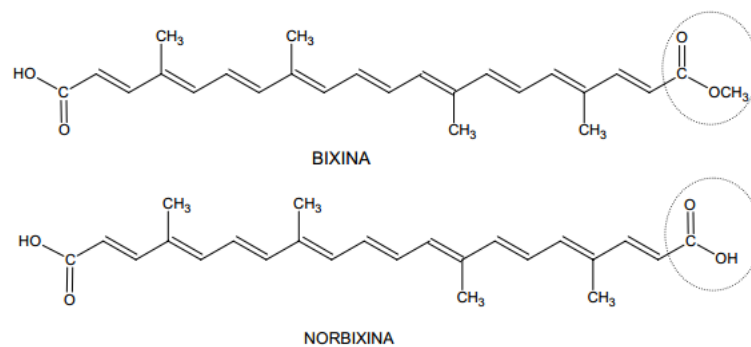


FIGURA 4 - ESTRUTURA DA BIXINA E DA NORBIXINA.  
 FONTE: RODRIGUEZ-AMAYA (2001); OLIVEIRA (2005); GARCIA (2012)

As diferenças estruturais conferem à bixina características lipossolúveis devido à presença do éster metílico na molécula, ao contrário da norbixina, com maior hidrossolubilidade em razão da presença do grupamento carboxila, sítio de interações com moléculas de água (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; OLIVEIRA, 2005; GARCIA *et al.*, 2012; GOLIN *et al.*, 2013). Estas particularidades determinam o tipo de pigmento a ser utilizado como corante e o uso de solventes apropriados para aplicação na indústria cárnea.

Os isômeros *cis*, tanto da bixina quanto da norbixina, estão presentes naturalmente na planta, sendo convertidos para a forma *trans* mais estável quando submetidos a altas temperaturas. Os isômeros *cis* e *trans* diferem em algumas características físicas. A bixina, embora solúvel em soluções de reduzida polaridade, quando presente na forma do isômero *cis* não apresenta extensa solubilidade em óleos vegetais em razão da significativa polaridade promovida pelos grupos ligantes situados no mesmo lado da estrutura. Por outro lado, a *trans*-bixina é solúvel em óleos e apresenta-se vermelha quando em solução, diferindo do isômero *cis*, de coloração alaranjada (SATYANARAYANA; PRABHAKARA RAO; RAO, 2003; RIOS; MERCADANTE, 2004; OLIVEIRA, 2005; GARCIA *et al.*, 2012).

Ambas, bixina e norbixina podem estar presentes em uma extração, tanto na forma cis como na trans (PRENTICE-HERNANDEZ; RUSIG; CARVALHO, 1993; SCOTTER *et al.*,1998; SCOTTER *et al.*,2000; SCOTTER; CASTLE; APPLETON, 2001). A bixina, em condições alcalinas, pode sofrer saponificação e produzir o ácido dicarboxílico livre, denominado norbixina. Em excesso de álcali, o ácido dicarboxílico dissocia-se para formar seu sal, geralmente de potássio ou sódio, solúvel em água (PIMENTEL; STRINGHETA, 1999).

Os carotenoides originados de *Bixa orellana* sofrem degradação quando expostos à luz ou submetidos a elevadas temperaturas (SATYANARAYANA; PRABHAKARA RAO; RAO, 2003; OLIVEIRA, 2005; GARCIA *et al.*, 2012). Sendo assim, a aplicação destes corantes em alimentos deve considerar as condições de processamento e armazenamento (SCOTTER *et al.*, 1994).

Embora a atividade antioxidante do urucum em carnes tenha sido observada em diversas avaliações, a ANVISA, por meio da Portaria nº1004, reconhece seu extrato como um aditivo de cor que pode ser utilizada em concentrações de até 0,002 g/100 g em produtos cárneos, não sendo permitido o uso deste aditivo em carnes frescas ou congeladas (BRASIL, 1998).

As sementes de urucum podem ser consideradas uma potencial fonte de antioxidantes naturais (GOLIN *et al.*, 2013a), estudos sistemáticos *in vivo* devam ser conduzidos para explorar a biodisponibilidade das fitomoléculas avaliadas, o seu uso deveria ser estimulado, tanto domesticamente quanto industrialmente nas áreas alimentícia, cosmética e farmacêutica (LEMOS, 2008).

### 2.7.1 Ação antioxidante dos carotenoides

Os carotenoides são constituídos de cadeias de polienos, em um longo sistema de duplas ligações conjugadas, rico em elétrons, responsável pela atividade antioxidante desses compostos tanto na absorção do oxigênio singlete quanto de radicais livres, para interromper as reações em cadeia onde eles estão envolvidos. (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; OLIVEIRA, 2005; COSTA, 2007; SILVA, 2010).

As concentrações plasmáticas de carotenoides são bons indicadores do consumo de frutas e hortaliças; evidências epidemiológicas associam altos níveis plasmáticos de beta ( $\beta$ )-caroteno e outros carotenoides com a diminuição do risco de câncer e doenças cardiovasculares. As propriedades antioxidantes dos carotenoides fundamentam-se na estrutura destes compostos, principalmente no sistema de duplas ligações conjugadas, tornando possível a captação de radicais livres, principalmente o radical alquilperoxila ( $\text{ROO}^*$ ) (CERQUEIRA, 2007).

Segundo Delgado (2000 apud UENOJO, 2007), as evidências epidemiológicas sugerem que a ingestão de  $\beta$ -caroteno pode inibir certos tipos de câncer e doenças mediadas por radicais livres. A capacidade dos carotenoides de atuar como agentes quelantes do oxigênio singlete é bem conhecida (FIGURA 5). Assim como a prevenção do câncer, o potencial antioxidante dos carotenoides pode ser útil na inibição de outras doenças provocadas pela ação dos radicais livres.

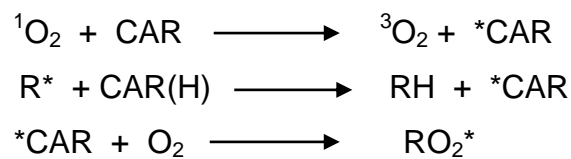


FIGURA 5 - REAÇÃO ENTRE CAROTENÓIDE E OXIGÊNIO SINGLETE  
 FONTE: MALDONADO-ROBLEDO(2003) E UENOJO (2007)

Uma vez formado, o carotenoide no estado excitado ( ${}^*\text{CAR}$ ) pode facilmente retornar ao estado fundamental, dissipando energia na forma de calor. Investigações sobre o tema revelam que a capacidade de um determinado carotenoide em quelar o oxigênio singlete ( ${}^1\text{O}_2$ ), está relacionada com o número de duplas ligações conjugadas e com os grupos ligados às extremidades da cadeia (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPES, 2000).

As reações dos carotenoides com radicais livres levam à transferência de elétrons ou possíveis reações adicionais. Na presença de um carotenoide e  $\text{O}_2$ , a reação do  ${}^*\text{CAR}$  com uma molécula de oxigênio pode levar à formação de um peróxido. Porém, em condições de altas pressões de oxigênio e elevadas concentrações de  $\beta$ -caroteno, esse pode agir como um pró-oxidante (UENOJO 2007).



Uma vez que os carotenoides em sistemas biológicos estão sempre associados com outros sistemas de óxido-redução, a interação com outros antioxidantes poderá gerar efeitos sinérgicos. Sabe-se que a estrutura dos carotenoides exerce grande influência sobre a atividade antioxidante. Outros compostos como, por exemplo, cataxantina e astaxantina apresentam melhores atividades antioxidantes que  $\beta$ -caroteno ou zeaxantina. A atividade antioxidante aumenta com o aumento do número de duplas ligações conjugadas, grupos cetona e presença de anéis ciclopentano em sua estrutura (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; MALDONADO-ROBLEDO, 2003).

Em diversos setores da indústria, o emprego de corantes naturais em substituição aos artificiais tem gerado um crescente interesse pelos produtos provenientes do urucum. Os métodos rudimentares frequentemente aplicados para obtenção destes produtos tendem a ser substituídos por processos mais elaborados visando reduzir os custos de processamento, mas também com o objetivo de agregar valor ao pigmento. Os produtos industrializados isentos de aditivos são de grande aceitação em diferentes regiões do mundo, destacando-se Europa e Japão (STRINGHETA, 2000).

## 2.8 COR DOS PRODUTOS CARNEOS CURADOS

Um dos maiores desafios para a indústria de carnes é oferecer produtos macios, suculentos, com cor e sabor agradáveis e com a manutenção destas características de frescor durante toda a sua vida de prateleira, com a maior segurança e o menor custo possíveis. Dentro deste aspecto, o estudo e o conhecimento das propriedades funcionais das matérias-primas e os fatores que as influenciam são imprescindíveis para garantir a satisfação dos clientes e os resultados econômicos dos fabricantes (OLIVO, 2002).

As cores são percebidas pelo indivíduo fisiologicamente normal quando a energia radiante da região visível do espectro (380 a 760) nm atinge a retina. As características da cor são, essencialmente, o tom ou matiz, a saturação ou grau de pureza e a luminosidade ou brilho. Na avaliação da acuidade visual de indivíduos,

alguns testes podem ser aplicados como, por exemplo, o de Munsell - Farnsworth 100 Hue Test (IAL, 2008). A percepção da cor ocorre por meio do estímulo de diferentes comprimentos de onda da luz. As cores são caracterizadas por: saturação: profundidade da cor; tonalidade: cor efetiva (vermelho, verde, azul), intensidade: brilho (o vermelho brilhoso tem mais intensidade que o vermelho fosco) (KAISER; BOYNTON, 1986).

Cerca de 8% dos homens e, 0,6% das mulheres são daltônicas. É mais usual confundir ou não identificar três cores do que duas ou uma cor. O teste mais utilizado para detecção do daltonismo é o teste de cores de Ishihara, criado em 1917 por um professor da Universidade de Tóquio (DUTCOSKY, 2013).

O consumidor associa a coloração vermelha das carnes à qualidade e frescor do produto. A manutenção da coloração tem relevante importância econômica, pois se trata de um fator decisivo no momento da aquisição e opção de compra pelo consumidor. O controle da cor nas carnes exige conhecimento das reações que envolvem as formas de pigmento. O ciclo dessas nas carnes é reversível e, portanto, à medida que ocorra associação de ligantes ao átomo de ferro da mioglobina (Mb) e alteração de sua valência, ocorre também a mudança da coloração no produto cárneo (SARANTÓPOULOS; PIZZINATTO, 1990).

A cor das carnes é o índice de frescor e qualidade mais evidente para o consumidor, sendo determinada pela proporção relativa das três formas de mioglobina: mioglobina reduzida (Mb - coloração vermelho púrpura), oximioglobina (MbO<sub>2</sub> - coloração vermelho brilhante) e metamioglobina (MMb - coloração marrom). Os pigmentos de mioglobina apresentam em sua estrutura um átomo de ferro, na Mb e MbO<sub>2</sub> o ferro encontra-se no estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>) enquanto na MMb o metal está na forma férrica (Fe<sup>3+</sup>) (PEGG; SHAHIDI, 1997).

Estudos envolvendo a adição de NaCl às carnes evidenciaram que o aumento da concentração salina é acompanhado pela redução do conteúdo de oximioglobina (MbO<sub>2</sub>) e aumento de metamioglobina (MMb) (TORRES *et al.*, 1988). O uso de NaCl no processamento de produtos cárneos está associado à oxidação do ferro ligado à mioglobina (Mb) da forma Fe<sup>2+</sup> para Fe<sup>3+</sup> (SHIMOKOMAKI; FRANCO; CARVALHO, 1987).

A avaliação da cor nos produtos cárneos indica que a presença de cloreto de sódio (NaCl), nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) e cozimento promovem mudanças nos parâmetros de cor avaliados pelo sistema CIELAB, que representa um dos

populares sistemas de colorimetria para mensuração de cor. No sistema  $L^* a^* b^*$ , o  $L^*$  corresponde a luminosidade, o eixo  $a^*$  (-) verde/(+) vermelho, o eixo  $b^*$  (-) azul/(+) amarelo. O centro representa os tons acromáticos (HUNTER LAB, 2008).

Esse é um sistema com uniformidade de cor dentro do espaço que foi desenvolvido para reduzir os problemas do sistema XYZ, as dimensões x e z, são para relacionar dimensões de cor, a dimensão y é para luminosidade claro ou escuro, onde, no eixo X temos os comprimentos de onda de 400nm – 700nm e no eixo Y temos a % de refletância (SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006; HUNTER LAB, 2008).

A coloração dos produtos cárneos, conferida pela mioglobina, é um fator importante para aceitabilidade do consumidor e indicativo de qualidade. Há associação entre a oxidação lipídica com esse pigmento e sua influência na coloração da carne, o que induz a realizar estudos sobre antioxidantes (BENEDETTI *et al.*, 2011).

## 2.9 CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM PRODUTOS CÁRNEOS

A Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2006) explica que muitos fatores complicam a avaliação e controle microbiológico, a maioria dos riscos de origem alimentar deve ser controlada em múltiplos pontos do abastecimento alimentar.

Abordagens para melhorar segurança alimentar e prevenir doenças transmitidas por alimentos (DTAs) incluem instituir medidas de controle em pontos intermediários na cadeia alimentar e educação dos consumidores e trabalhadores de alimentos. O impacto das medidas de controle individuais (vacinação animal, rotulagem de carne, temperatura de armazenagem e transporte, etc.) devem ser avaliados, pois, são muito complexos e exigem fontes de dados adicionais sobre a redução de doenças transmitidas por alimentos por certos agentes patogênicos, como por exemplo, *Salmonella enterica* (OLSEN *et al.*, 2001).

Equipes interdisciplinares de epidemiologistas e especialistas em segurança alimentar de todas as agências governamentais devem ser formadas para investigar casos esporádicos e associados ao surto de origem alimentar, para identificar os

microrganismos alimentares e a série de eventos que levam às doenças. Em países onde a vigilância é esporádica, dados úteis para o controle de alimentos e sua avaliação devem ser compartilhados.

Como os recursos permitirem, os países devem integrar sistemas de vigilância em diferentes agências responsáveis por rastrear doenças humanas, contaminação alimentar, animais, doenças das plantas, e os fatores comportamentais e ambientais importante para a segurança alimentar e prevenção de doenças de origem alimentar (ICMSF, 2006).

Parâmetros microbiológicos preconizados na RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde (ANVISA/MS) para produtos cárneos reestruturados consistem em pesquisa de *Salmonella* spp.; determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes, contagem de estafilococos coagulase positiva e contagem de clostrídios sulfito redutores a 46°C

As propriedades da hortelã com as atividades antimicrobianas da quitosana em estudo como conservantes de produtos cárneos suínos demonstraram que a combinação foi mais eficaz contra bactérias Gram positivas. A vida útil de contagem bacteriana foi aumentada em amostras tratadas e armazenadas em 0-3 °C durante três semanas (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2008).

Efeitos do extrato liofilizado *Urtica dioica* L. (LUWE) e embalagem em atmosfera modificada (MAP) foram investigados quanto a qualidade e a vida útil de carne moída. Carne moída foi armazenado como controle aeróbico, MAP (80% de O<sub>2</sub> + 20% de CO<sub>2</sub>), MAP e 250 ppm LUWE e MAP e 500 ppm LUWE em 2±0,5°C durante 14 dias. MAP e LUWE tiveram efeitos significativos sobre as bactérias do ácido mesófilos, psicotróficos e lácticas e contagem de *Pseudomonas*, quando utilizado 500ppm de LUWE (ALP; ASKU, 2010).

O aumento progressivo da demanda de alimentos cárneos congelados ou refrigerados estimula os estudos para prolongar a vida útil destes alimentos. Tentando eliminar micro-organismos um estudo injetou *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, em carne bovina e posteriormente, durante ensaio de vida de prateleira foi aplicada luz pulsada. Este tratamento não estendeu o prazo de validade dos produtos cárneos e teve um efeito negativo sobre a qualidade sensorial do produto (HIERRO *et al.*, 2012).

A adição de óleos essenciais de coentro (*Coriandrum sativum* L.) e hissopo (*Hyssopus officinalis* L.) na concentração (0,02%) foram avaliadas quanto à sua

atividade microbiológica em carne moída embaladas a vácuo e armazenadas a  $0,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  e  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 15 dias. No entanto, o armazenamento de carne a uma temperatura mais baixa de  $0,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , sem a adição de óleos tiveram um efeito mais positivo sobre atividade microbiana (até 3 ciclos log) e manutenção da qualidade sensorial de armazenamento de carne a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$  com óleos adicionados. (MICHALCZYK *et al.*, 2012).

Extratos de frutas silvestres de *Nitraria retusa* foram utilizados em pastéis de carne moída durante nove dias de armazenamento a  $4^{\circ}\text{C}$ , o extrato foi capaz de retardar o crescimento microbiano durante o armazenamento refrigerado por nove dias e prazo de validade foi estendido quando comparado ao controle (MARIEM *et al.*, 2014).

Vários estudos atualmente estão sendo feitos com a intenção de aumentar a vida útil de produtos cárneos, além de antimicrobianos naturais e sintéticos, cresce também a utilização de atmosfera modificada juntamente com uma embalagem apropriada para impedir o desenvolvimento de micro-organismos (COMA, 2008; HAYES *et al.*, 2010; DJENANE *et al.*, 2012; GÓMEZ; LORENZO, 2012; OLIVEIRA, SOARES; PICCOLI, 2013; LIMBO *et al.*, 2013; MURPHY, GRADY; KERRY, 2013; STELZLENI, PONRAJAN; HARRISON, 2013; LAVIERI; WILLIAMS, 2014).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Sementes de *Bixa orellana* L. foram coletadas na fazenda experimental do IAPAR (Instituto Agronômico do Paraná), Rodovia Miguel Buffara, km 8, Morretes, Paraná, Brasil. Caixa Postal nº 11 - 83350 000 Fone/Fax: 55 (41) 3462-1203, Estação Experimental de Morretes EST.: Morretes / CÓD.: 02548038 / LAT.: 25°30´S/ LONG.: 48°49´W / ALT.: 59m, nos meses de junho e julho de 2012.

A identificação da espécie vegetal (FIGURA 6) foi realizada pelo biólogo e curador Osmar dos Santos Ribas do Museu Botânico Municipal de Curitiba, onde está depositada a exsicata sob o número: 379.394 (FIGURA 7).



FIGURA 6 - IDENTIFICAÇÃO REALIZADA NO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA-PR, BRASIL  
FONTE: A autora (2014)



FIGURA 7 - EXSICATA DE *BIXA ORELLANA* L. DEPOSITADA JUNTO AO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA-PR, BRASIL  
 FONTE: A autora (2014)

### 3.2 OBTENÇÃO DA BIXINA E SAL DE BIXINA

#### 3.2.1 Tratamento da matéria prima

Aproximadamente 50 kg de sementes foram coletadas e retiradas das cápsulas. As sementes foram desidratadas em estufa a 50°C e estabilizadas em local fresco e arejado, protegidas de raios solares e umidade. Após este processo, o material foi triturado para aumentar a superfície de contato com o solvente e facilitar a extração dos carotenoides conforme os trabalhos de (SONAGLIO *et al.*, 1999; OLIVEIRA, 2005; COSTA, 2007).

A extração da bixina foi realizada segundo metodologia descrita por Costa (2007), utilizando a técnica de extração em aparelho Soxhlet modificado com aplicação farmacotécnica com gradiente de polaridade crescente (CARVALHO, 2009).

Foram obtidos 1980kg das sementes desidratadas e fragmentadas da espécie *Bixa orellana* L. variedade vermelha. Para a extração da bixina Foi empregado inicialmente o solvente *n*-hexano em um período de aproximadamente

seis horas. O mesmo período de tempo foi utilizado para os solventes clorofórmio, acetato de etila e etanol.

### 3.2.1 Identificação da bixina

Durante a extração clorofórmica foram obtidos cristais de coloração vermelho-púrpura. Para identificação e caracterização foram utilizadas as técnicas de determinação do ponto de fusão; Espectroscopia no Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H) e Carbono (RMN<sup>13</sup>C) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O ponto de fusão foi determinado com o auxílio do aparelho Marte<sup>®</sup>, modelo III.

A metodologia de IV foi realizada na amostra pastilhada com brometo de potássio (KBr), empregando equipamento Bomem-Hartmann e Braum série MB Biored<sup>®</sup> FTS 3500 GX, com leitura de transmitância entre 400 e 4000 cm<sup>-1</sup> e detector de elementos deuterados de sulfato de triglicina (*deuterated triglycine sulfate detector elements*, DTGS). Por sua vez, as técnicas de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C foram executadas no Departamento de Bioquímica da UFPR utilizando espectrofotômetro RMN Brukers<sup>®</sup> AVANCE III HD 600. As amostras foram preparadas empregando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) como solvente Cambridge Isótopos Laboratories<sup>®</sup>.

A análise cromatográfica foi efetuada em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Pro Star Gradiente VARIAN<sup>®</sup>, modelo 410, série 50492) com detector de arranjo de fotodiodo (modelo 335) e coluna C18 (VARIAN<sup>®</sup>, 5 μm, 150 x 4,6 mm) de fase reversa. A temperatura utilizada foi de 29°C com sistema de separação isocrático, sendo a fase móvel composta por 85% de acetonitrila J.T. Baker<sup>®</sup> EUA e 15% de fase ácida (ácido sulfúrico 0,05 M e ácido fosfórico a 1%). O fluxo foi de 1 mL/minuto e o comprimento de onda 470 nm, com tempo de corrida de 8 minutos. Para a avaliação, a amostra foi diluída em metanol grau HPLC J.T. Baker<sup>®</sup> México.

A curva analítica foi preparada entre 2,45 e 78,4 mg/mL (n=7), por meio do método adaptado de Scotter e colaboradores (1994), Roussef (1988), Rios e Mercadante (2004), Oliveira (2005), Noppe e colaboradores (2009), utilizando bixina e norbixina dissolvidas em metanol.



### 3.2.2 Síntese do sal de bixina e análise por CLAE

A conversão de bixina em sal foi realizada para proporcionar maior polaridade à molécula, por meio de adaptação dos trabalhos de Rios e Mercadante (2004); Silva; Nachtigall e Stringheta (2009), onde foi utilizado Hidróxido de Potássio (10%) diluído em água destilada 50ml (m/v) e um grama de bixina, sem aquecimento e, posteriormente, filtrado em funil de vidro sinterizado. Após a filtragem o material foi levado a estufa a 50°C para secagem. Através dos cromatogramas obtidos por CLAE verificou-se que em todas as etapas de análise não houve a formação de produtos de degradação com  $\lambda$  max entre 250 e 600 nm.

### 3.3 PREPARO DOS PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS

As amostras foram processadas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Farmácia da UFPR. Para elaboração dos produtos cárneos reestruturados foram utilizadas amostras de patinho traseiro bovino (*Vastus lateralis*) adquiridas no comércio de Curitiba. A carne foi moída em disco de 3,5mm de diâmetro em moedor industrial (CAF<sup>®</sup>), posteriormente a massa cárnea foi homogeneizada com os diferentes tratamentos estudados. Foram utilizadas as seguintes combinações de nitrito e sal de bixina (TABELA 1):

TABELA 1 - FORMULAÇÕES DAS AMOSTRAS DE REESTRUTURADOS

Tratamento	Água (%)	Nitrito(ppm)	Sal de bixina(ppm)	Cloreto de sódio (%)
CTRL	10	-	-	1,4
BIX	10	-	500	1,4
BIXNIT	10	75	250	1,4
NIT	10	150	-	1,4

FONTE: A autora (2014)

NOTA: CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT=(250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>).

O controle (CTRL) foi elaborado isento da combinação de nitrito e sal de bixina. Um lote de amostras (NIT) foi elaborado somente com nitrito de sódio na condição máxima prevista na legislação (150 ppm). (BIXNIT) foi elaborado misturando nitrito (75 ppm) e sal de bixina (250 ppm). Por fim, em um terceiro

tratamento o nitrito foi totalmente submetido por sal de bixina (500 ppm). As combinações de aditivos foram diluídas em volume de água proporcional a 10% da massa cárnea (p/v). Em cada tratamento foram utilizados 3.500kg e amostra reestruturada continha 100g.

Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas com as respectivas combinações de aditivos durante cinco minutos, em seguida pesadas ( $100g \pm 0,1$ ) e modeladas em fôrma de hambúrguer. As amostras foram mantidas congeladas a  $-16^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) até o final das análises de vida de prateleira. Para as amostras grelhadas padronizou-se o tratamento térmico durante 3 minutos de cada lado alcançando uma temperatura interna próxima a  $73^{\circ}\text{C} \pm 2$  avaliada por meio de termômetro digital (Thermometer<sup>®</sup>) modelo SH-113.

### 3.3.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA E PRODUTO REESTRUTURADO

A matéria-prima cárnea e as amostras processadas foram caracterizadas quanto à composição química e pH segundo os métodos a seguir:

#### 3.3.2 Umidade

A determinação de umidade foi realizada com repetição de cinco vezes em estufa de convecção dotada de circulação de ar (Nova Ética<sup>®</sup>, 420-2D) a  $105^{\circ}\text{C}$ , de acordo com a Associação Oficial de Química Analítica Oficial (*Association of Official Analytical Chemistry*, AOAC, 1995).

### 3.3.3 Proteínas

A determinação de proteínas foi realizada com repetição de cinco vezes segundo o método de Kjeldahl adotando-se o fator 6,25 para conversão do nitrogênio (AOAC, 1995).

### 3.3.4 Lipídios

A determinação de lipídios foi realizada com repetição de cinco vezes empregando-se a técnica de hidrólise ácida, utilizando-se água fervente e ácido clorídrico 8,0 N, seguida de aquecimento por 15 minutos, filtração do material e secagem do papel de filtro em estufa a 105° C por duas horas. O material foi submetido à extração em Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo e determinando-se a quantidade de lipídios por diferença de peso (AOAC, 1995).

### 3.3.5 Determinação de resíduo mineral fixo

A determinação de resíduo mineral fixo foi realizada com repetição de cinco vezes pela incineração em mufla (cinzas), de acordo com método descrito por AOAC (1995).

### 3.3.6 Determinação do pH

O pH foi realizado com repetição de cinco vezes e medido em potenciômetro (Hanna®) - HI 8313, após calibração em pH 4,0 e 7,0 segundo AOAC (1995).

### 3.3.7 Determinação da concentração residual de nitritos

As amostras em triplicata dos produtos reestruturados foram homogeneizadas e aproximadamente 10 gramas ( $\pm 0,001$ ) foram tomadas e adicionadas de 5,0 mL de tetraborato de sódio e 50,0 mL de água aquecida a 80°C. Após 15 minutos em Banho-Maria com agitação (Solab<sup>®</sup>) modelo SL-155/22-8 (80°C), as amostras foram transferidas para balão volumétrico e adicionadas de 5,0 mL de ferrocianeto de potássio e 5,0 mL de acetado de zinco, com agitação por 2 minutos entre cada adição de reagente. O volume foi completado para 250 mL com água destilada e então as amostras permaneceram em repouso por 30 min. Após filtração, uma alíquota de 10 mL foi coletada e adicionada de  $\alpha$ -naftol (Vetec<sup>®</sup>) e sulfanilamida (Isofar<sup>®</sup>) em meio ácido, para desenvolvimento de cor e mensuração em espectrofotômetro a 540 nm. Os cálculos e quantidade de nitrito foram determinados por meio de uma curva padrão previamente estabelecida (IAL, 2008).

## 3.4 EFEITO DO SAL DE BIXINA SOBRE A COR DOS PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS

O efeito do sal de bixina sobre a cor de produtos cárneos reestruturados foi avaliada nos tempos 0 (fim do processo), 30<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dias de prateleira nas amostras cruas e grelhadas. As amostras foram transferidas das embalagens e expostas sobre uma superfície lisa sendo realizadas oito leituras de cada amostra em pontos diferentes. Nas amostras grelhadas a leitura foi imediatamente após o tratamento térmico. As análises de cor foram realizadas no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As análises foram realizadas utilizando um aparelho espectrofotômetro portátil, iluminante D65 mimetiza a luz do dia – 6500 K e ângulo 45/0, utilizou-se colorímetro (HUNTER LAB<sup>®</sup>) miniscan XE PLUS, pelo sistema L\*, a\*, b\*. Os valores de luminosidade L\* (luminosidade), a\* (componente vermelho-verde), b\*

(componente azul-amarelo) foram expressos no sistema de cor CIELAB (HUNTER LAB, 2008), o aparelho foi calibrado utilizando uma placa preta e uma cerâmica padrão branca ( $X = 78,9$ ,  $Y = 83,9$ ,  $Z = 88,9$ ). Para analisar a cor da carne dos produtos reestruturados e relacionar entre as amostras que receberam tratamentos diferentes, foi utilizado o Sistema CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), onde o valor de  $L^*$ , situado no eixo vertical do diagrama de Hunter, mede a luminosidade ou a percentagem de reflectância, variando de 0 (preto) para 100 (branco). O valor de  $64 a^*$ , situado no eixo horizontal, mede a variação entre a cor verde e a vermelha e o valor de  $b^*$  mede a variação entre o azul e o amarelo (SHIMOKOMAKI, 2006 HUNTER LAB, 2008).

### 3.5 OXIDAÇÃO LIPÍDICA – TESTE DO ÁCIDO 2-TIOBARBITÚRICO

A oxidação lipídica foi avaliada nos quatro diferentes tratamentos (CTRL; BIX; BIXNIT; NIT), no tempos 0 (final do processamento), 30 e 60 dia utilizando-se o método do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) conforme procedimento descrito por Tarladgis e colaboradores (1964). Esta metodologia consiste na determinação espectrofotométrica à 532 nm do complexo de coloração vermelha formado pela condensação de dois moles de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (J.T.Baker<sup>®</sup>-Austria), com um mol de malonaldeído e/ou outras substâncias que reagem com o TBA.

Neste procedimento, 10g de amostra triturada, em duplicata da triplicata, foram homogeneizadas em um enlenmeyer de 500 mL com 97,5 ml de água destilada, 2,5 mL de ácido clorídrico 4N, 2 gotas de anti-espumante e algumas pérolas de vidro. Em seguida, esta solução foi destilada durante 10 minutos e foram coletados 50 mL do destilado em erlenmeyer de 125 mL. Foram retiradas em triplicata, alíquotas de 5 mL do destilado e foram transferidas para um tubo de ensaio de tampa rosqueável. Foram adicionados ao destilado 5 mL de TBA 0,02M e estes, após o tubo ser herméticamente fechado, foram aquecidos em banho-maria fervente por 35 minutos, resfriados à temperatura ambiente e realizada a leitura em espectrofotômetro à 532 nm.

Foi preparada uma curva padrão utilizando solução de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>-EUA), em água destilada, nas

concentrações de 0,10 a 7,0 M de TEP. Os resultados foram expressos em mg de TBARS/Kg de amostra. Realizou-se o teste de recuperação do método, visando a precisão do procedimento. Este consistiu em aplicar o método descrito acima em três condições diferentes: 1) para uma solução de TEP de concentração conhecida  $1 \times 10^{-5}$  M; 2) para 10g da amostra e 3) para 10g da amostra e 10 mL da solução de TEP  $1 \times 10^{-5}$  M.

### 3.6 ANÁLISE SENSORIAL

A avaliação sensorial dos tratamentos foi realizada por meio de um teste de ordenação de preferência. Avaliação envolveu um painel formado por 30 provadores não-treinados que utilizaram notas de 1 (menos agradável) a 4 (mais agradável) para ordenar sua preferência pelas amostras formuladas segundo os 4 diferentes tratamentos (CTRL; BIX; BIX:NIT; NIT). A somatória das notas foi utilizada para indicar as amostras mais apreciadas pelos provadores (IAL, 2008). As amostras apresentavam conformidade com parâmetros microbiológicos preconizados pela legislação (BRASIL, 2001) e este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética – CAAE: 22206713.9.0000.0102 (item 3.10).

### 3.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A matéria-prima e amostras tratadas foram avaliadas quanto aos parâmetros microbiológicos preconizados na RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde (ANVISA/MS). Esses consistem em pesquisa de *Salmonella* spp.; determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes, contagem de estafilococos coagulase positiva e contagem de clostrídios sulfito redutores a 46°C. Para a detecção, isolamento e identificação de contaminantes microbianos foi utilizada a metodologia básica descrita no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, (2001), utilizando critério de contagens em Unidades Formadoras de Colônia por grama de

amostra (UFC/g), sendo a pesquisa realizada em 25 gramas do produto homogeneizado.

### 3.7.1 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A figura 8 representa um esquema do procedimento para detecção de *Salmonella* spp.

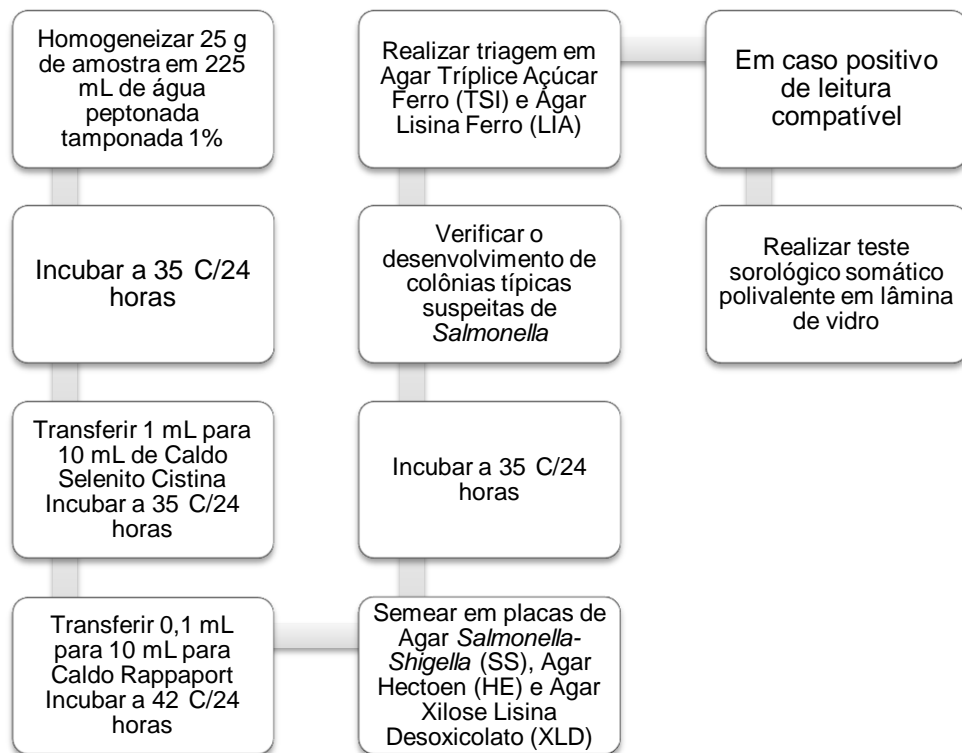


FIGURA 8 - PROCEDIMENTOS PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* spp.  
 FONTE: ADAPTADO DE FDA (1995)

Foram homogeneizados em “stomacher” Seward® (modelo 400 circulator), 25 g de amostras cárneas em 225 mL de água peptonada tamponada a 1%. Após incubação em incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-254/240L a 35±1°C por um período de 24 horas, o volume de 1 mL dessa suspensão foi transferido para 10 mL de Caldo Selenito-Cistina utilizando Cabine de Segurança Biológica Veco® modelo Biosafe plus A2, e incubado nas mesmas condições 35°C/24 h. Um volume de 0,1 mL foi inserido em 10 mL de caldo Rappaport e esses foram incubados em

incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-154/127L a  $42 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após o período de incubação foram realizadas sementeiras por esgotamento em placas de Petri, contendo Agar Salmonella-Shiguelia (SS), Agar Hectoen (HE) e Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) conforme esquema (FIGURA 8). Sequencialmente as placas foram incubadas a  $35 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Foi verificada se houve o desenvolvimento de colônias suspeitas de *Salmonella* spp. No meio de cultura HE as colônias típicas dessa bactéria se apresentam transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro negro. As cepas fortemente produtoras de sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) podem produzir colônias inteiramente enegrecidas. No Agar SS, colônias típicas são geralmente transparentes com centro negro (FIGURA 9). Em Agar XLD, são observadas colônias transparentes, cor de rosa escuro, com ou sem centro negro e cepas fortemente produtoras de  $\text{H}_2\text{S}$  podem demonstrar colônias com centro negro grande e brilhante, ou mesmo totalmente negras. As cepas fermentadoras de lactose ou sacarose produzem colônias amareladas com ou sem centro negro. Diversas cepas do gênero *Salmonella* podem apresentar colônias amarelas transparentes típicas, com ou sem centro negro.

Essas colônias foram identificadas em Agar Ferro Tríplice Açúcar, (TSI) e Agar Lisina Ferro (LIA) e, de maneira complementar, foi realizado sorologia com antissoro polivalente em lâmina de vidro.

#### 3.7.1.1 Confirmação bioquímica de *Salmonella* spp.

Para a confirmação bioquímica, com o auxílio de uma agulha estéril descartável de inoculação, em Cabine de Segurança Biológica Veco® modelo Biosafe plus A2, foi removida uma porção da massa de células do centro da colônia típica e inoculada em tubos inclinados de Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e Ágar Lisina Ferro (LIA). A inoculação foi feita por picada e estrias na rampa, utilizando-se a mesma alçada para inocular ambos os tubos. Foram submetidas à confirmação preliminar pelo menos duas colônias típicas de cada placa, nos tubos de TSI e LIA. Os tubos foram incubados em incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-254/240L a  $35 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas e foi observado se houve ocorrência de reações típicas de *Salmonella* spp. nos meios de cultura avaliados. No Agar TSI as reações



típicas são caracterizadas pela rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H<sub>2</sub>S (escurecimento do ágar). Já no Agar LIA, essas reações exibem o fundo e rampa alcalinos (roxo, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H<sub>2</sub>S (escurecimento do meio).

### 3.7.1.2 Confirmação sorológica de *Salmonella* spp.

A confirmação sorológica foi realizada para detecção dos antígenos somáticos (poli O). Para isso, foram marcados dois quadrados de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> em uma lâmina de vidro, usando um lápis de material hidrofóbico. A seguir, foi adicionada uma gota de solução salina 0,85% estéril em um dos quadrados e uma gota de antissoro somático polivalente anti-*Salmonella* no outro. Uma parte da colônia suspeita foi emulsionada na gota de solução salina e outra parte na gota de antissoro, segurando a lâmina contra um fundo preto bem iluminado. Foram realizados movimentos leves de inclinação no quadrado com antissoro. A aparência da emulsão no quadrado com salina (controle negativo) foi utilizada para comparação, a fim de não ocorrer confusão entre a turbidez da emulsão e uma reação de aglutinação (FIGURA 10).

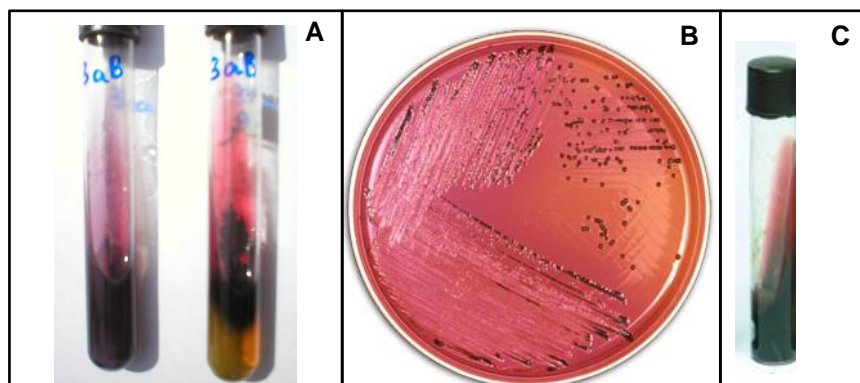


FIGURA 9 – REAÇÕES TÍPICAS DE *Salmonella* NOS MEIOS: LIA (A) SS (B) E TSI (C)

FONTE: LACOMA; SCIENTIA; HIMEDIALABS (2014).

NOTA: LIA: Agar lisina ferro; SS: Agar *Salmonella-Shigella*, TSI: Agar tríplex açúcar ferro. Colônias típicas no Agar SS são geralmente transparentes com centro negro.



FIGURA 10 - REAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO  
FONTE: MISODOR (2014)

### 3.7.2. Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes

A técnica utilizada consiste na de tubos múltiplos, a qual contém quatro séries de três tubos em cada diluição ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ). Foi usado como meio presuntivo o Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), com incubação em incubadora refrigerada Panasonic<sup>®</sup> modelo Mir-254/240L a  $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por períodos de 24 e 48 horas. Os tubos positivos com presença de gás foram repicados para Caldo *Escherichia coli* (EC) e incubados em Banho-Maria com agitação Solab<sup>®</sup> modelo SL-155/22-8 a  $45^{\circ}\text{C}$  durante 24 e 48 horas. A determinação do Número Mais Provável de coliformes por grama (NMP/g) em incubadora refrigerada Panasonic<sup>®</sup> modelo Mir-154/127L a  $45^{\circ}\text{C}$  foi feita pela Tabela de Hoskins (SPECK, 1984) (FIGURA 11).

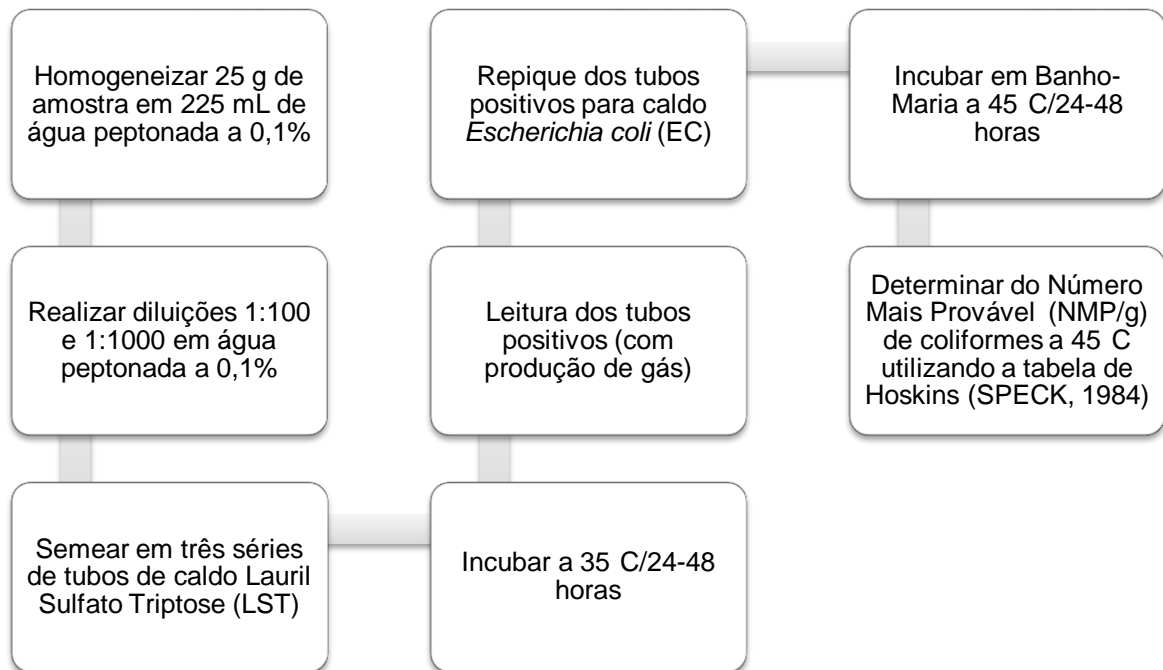


FIGURA 11 - ESQUEMA DEMONSTRADO A TÉCNICA DE NMP DE COLIFORMES A  $35^{\circ}$  E  $45^{\circ}\text{C}$   
FONTE: ADAPTADO DE FDA (1995)

### 3.7.3 Contagem de estafilococos coagulase positiva

Em placas contendo Agar Baird-Parker suplementado com emulsão de gema de ovo a 20% em solução fisiológica e solução de telurito de potássio a 1% em água, foi inoculado um volume de 0,1 mL das diluições selecionadas de amostra. Com o auxílio de alça de Drigalski, a amostra foi espalhada no meio até completa absorção. A seguir, as placas foram incubadas em incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-254/240L a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. Após incubação, foram selecionadas as placas que continham entre 20 e 200 colônias com as seguintes características: negras, brilhantes, convexas e com uma borda branca (1 a 1,5 mm de diâmetro após 24 horas e 1,5 a 2,0 mm após 48 horas) apresentando ao seu redor uma zona clara ou parcialmente opaca (FIGURA 12).

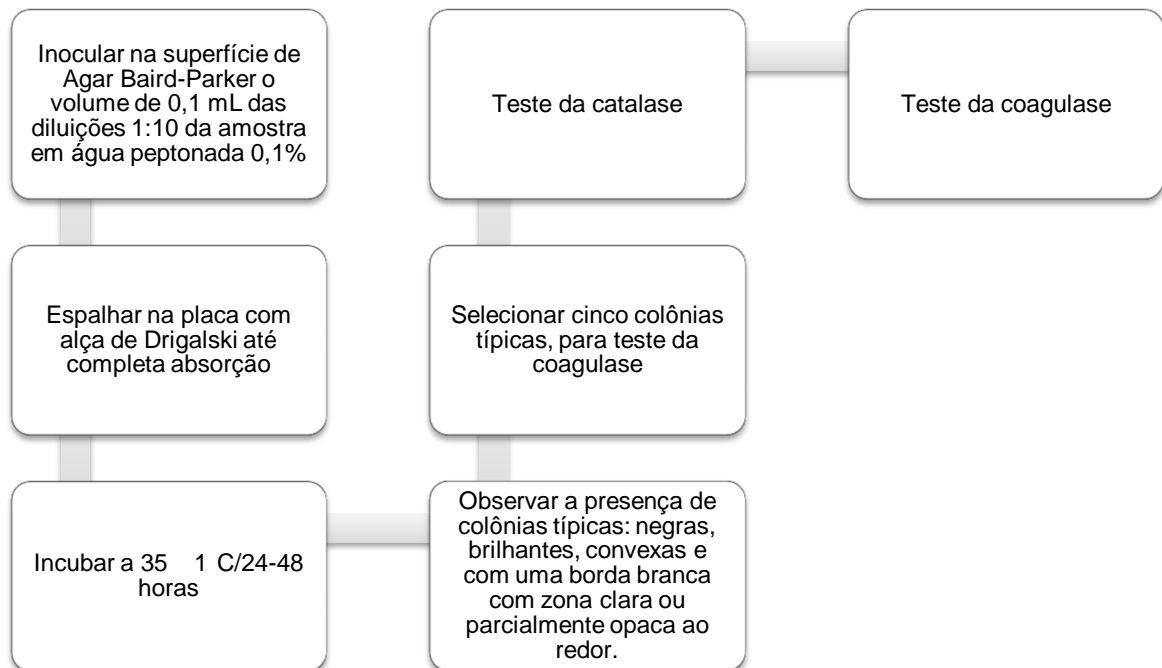


FIGURA 12 - TÉCNICA DE DETECÇÃO DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA  
 FONTE: ADAPTADO DE FDA (1995)

Foram selecionadas cinco colônias típicas para teste de coagulase. Quando ocorreu a presença de um número inferior a cinco, foram selecionadas todas as

colônias. Nos casos em que a placa apresentou colônias suspeitas de mais de um tipo, típicas e atípicas, foram selecionadas cinco de cada tipo, ou um número proporcional à distribuição dos diferentes tipos nas placas. Cada colônia foi inserida em um tubo de Caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI), emulsionada e a seguir, foi transferida uma alçada de cada tubo de BHI para tubos com Ágar Trypticase de Soja (TSA) inclinados. Os tubos foram incubados em incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-254/240L 35 - 37°C por um período de 18 a 24 horas. A cultura TSA foi reservada para teste adicional se necessário.

A partir dos tubos de TSA inclinados, foi coletada uma alçada da cultura em uma gota de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) 3%, em uma lâmina de vidro, nas cepas positivas para catalase ocorre o borbulhamento imediato (teste positivo). As cepas de *Staphylococcus aureus* são catalase positivas.

Teste da coagulase: foi transferido 0,5mL de cada cultura obtida em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), para um tubo estéril 10X100mm. Adicionou-se ao tubo 0,5mL de cultura, 0,5mL de coagulase plasma EDTA (plasma de coelho com EDTA) previamente hidratado segundo o fabricante New Prov®, misturou-se com movimento de rotação, sem agitar os tubos para não interferir na coagulação, incubou-se a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  e observou-se periodicamente durante seis horas se há formação de coágulo. Ao observar os tubos, estes não foram agitados com objetivo de evitar o rompimento do coágulo. Ao final das seis horas, a leitura é feita da seguinte forma: formou-se um coágulo firme que não se rompeu quando o tubo foi virado para baixo, reação positiva de nível 4+, houve coagulação da maior parte do tubo, formando um coágulo grande e organizado, considerado reação positiva nível 3+, houve formação de um pequeno coágulo organizado caracteriza reações positivas de nível 2+ ou 1+ respectivamente. As reações de nível 4+ ou 3+ são confirmativas da presença de *S. aureus*

#### 3.7.4 Métodos de análise de Clostrídios sulfito redutores a 46°C

A técnica emprega a metodologia de semeadura em profundidade. Um volume de 1 mL das diluições decimais da amostra foi inserido em placas de Petri estéreis. A seguir, aproximadamente 15 mL de Agar Tryptose Sulfito Cicloserina

(TSC) suplementado com solução a 4% de *D*-Cicloserina foi vertido sobre a amostra nas placas. O meio foi previamente fundido e resfriado a 45°C. A amostra e o meio de cultura foram homogeneizados com movimentos em oito. A secagem das placas foi aguardada e, posteriormente, a superfície dessas foi coberta com uma camada adicional de TSC (ABRAHÃO, 2008).

Após completa solidificação da camada adicional, as placas foram incubadas em incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-154/127L sem inversão a 46°C por 18 a 24 horas, em atmosfera anaeróbica. Para a obtenção da condição de anaerobiose atmosférica, foram utilizadas jarras com sistemas geradores de anaerobiose disponíveis comercialmente (ABRAHÃO, 2008).

As placas contendo 20 a 200 colônias foram selecionadas e foi realizada a contagem das colônias negras, típicas de clostrídios sulfito redutores e de *Clostridium perfringens* em Agar TSC (ABRAHÃO, 2008). No caso do Agar TSC com gema de ovo, as colônias podem ou não apresentar halo de precipitação devido à reação de lecitinase com gema de ovo (SILVA, 2007).

Cinco colônias típicas foram selecionadas e transferidas para o Meio de Tioglicolato (TGM). O meio contendo as colônias foi incubado a 46°C por 4 horas em incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-154/127L. As colônias não puras foram purificadas por estrias em Ágar TSC (a partir do TGM) e novamente inoculadas no TGM antes da realização das provas bioquímicas (SILVA, 2007).

#### 3.7.4.1 Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina

Os testes foram realizados em meio Meio de Lactose Gelatina (LGM). Uma alçada foi inoculada em tubos de LGM (previamente desaerados com fervura em Banho-Maria fervente com agitação Solab® modelo SL-155/22-8e choque térmico em gelo reciclável) e incubados em incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-254/240L a temperatura de 35-37°C por período de 24 a 48 horas. Foi observado se ocorreu a formação de bolhas e viragem ácida do indicador (vermelho de fenol), alterando a cor do meio de vermelha para amarela (fermentação de lactose positiva), ou se o meio permaneceu com a cor inalterada (fermentação de lactose negativa). Os tubos foram transferidos para geladeira e mantidos refrigerados por duas horas,

sendo observado se o meio permaneceu líquido (hidrólise de gelatina positiva) ou se adquiriu uma consistência firme (hidrólise de gelatina negativa). *Clostridium perfringens* fermenta lactose e hidrolisa gelatina (SILVA, 2007).

#### 3.7.4.2 Teste de redução do nitrato e teste de motilidade

Com o auxílio de uma agulha, foi inoculada a cultura por picada, no centro de Agar Nitrato Motilidade (ANM) previamente desaerado, até uma profundidade distante 1 cm do fundo do tubo. Os tubos foram incubados em incubadora refrigerada Panasonic® modelo Mir-254/240L a 35-37°C por 24 horas e sequencialmente foi realizada leitura do teste de motilidade por meio da verificação da migração de células para regiões fora da linha de inoculação (motilidade positiva) ou se o crescimento permaneceu restrito à região da picada (motilidade negativa). Para realização do teste de redução do nitrato, foram adicionados aos tubos de cultura 0,1 mL de cada um dos reagentes (A = solução 0,8% de ácido sulfanílico; B = solução 0,5% de alfa naftol). Se o meio adquire cor vermelha, há indicativo da presença de nitrato, ou seja, teste negativo. Em caso negativo o meio fica da cor do reativo amarelo (SILVA, 2007).

#### 3.7.4.3 Expressão dos resultados

Foram consideradas como culturas de *Clostridium perfringens* aquelas que apresentaram as seguintes características: fermentação da lactose (+), hidrólise da gelatina (+), redução do nitrato (+), motilidade (-). Caso alguma das reações se apresente atípica, adicionalmente foi verificada a capacidade de fermentação da rafinose (usualmente positiva) e da salicilina (usualmente negativa). A próxima etapa consistiu em calcular o número de UFC/g em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas (FIGURA 13).

UFC/g = diluição x número de colônias típicas x porcentagem de colônias confirmadas dentre as suspeitas

FIGURA 13 - EQUAÇÃO PARA CÁLCULO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS DE *Clostridium perfringens* POR GRAMA DE PRODUTO.  
 FONTE: SILVA (2007)

Resumidamente, esquematiza-se a técnica de contagem de *Clostridium perfringens* por meio do método de semeadura em profundidade (FIGURA 14).

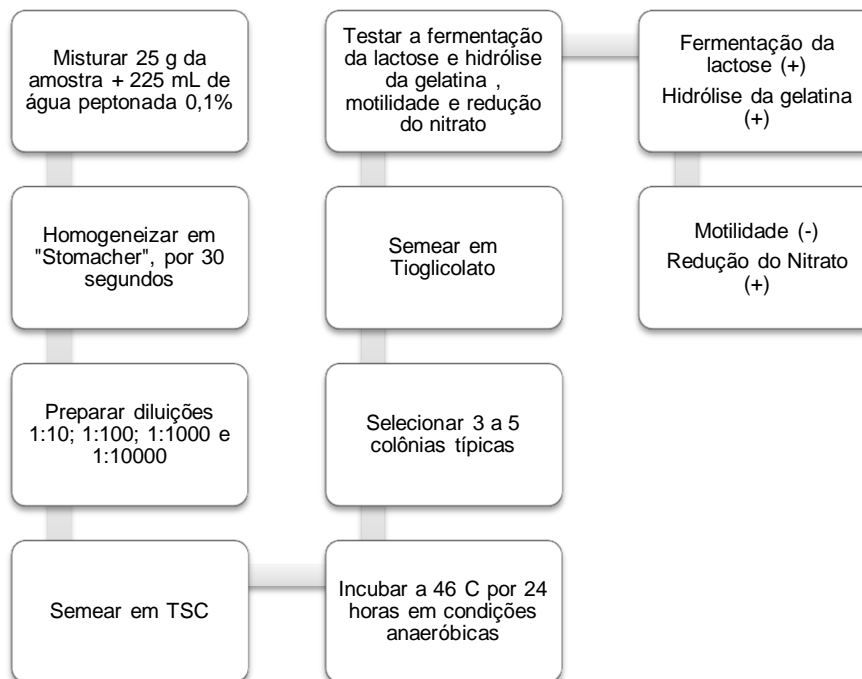


FIGURA 14 - TÉCNICA DE CONTAGEM DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* PELO MÉTODO DE SEMEADURA EM PROFUNDIDADE  
 FONTE: FDA (1995)  
 NOTA: TSC: AGAR TRIPTOSE SULFITO CICLOSERINA.

Para a quantificação de clostrídios sulfito redutores foi utilizada a técnica de contagem direta em placas. Para isso, foram empregados os mesmos meios de cultura aplicados à contagem de *Clostridium perfringens* com incubação a 46°C durante 24 horas em condições anaeróbicas. A confirmação foi resumida à

coloração de Gram, sendo reconhecidas as culturas Gram positivas na forma de bastonetes (ANVISA, 2001).

### 3.8 ASPECTOS ÉTICOS

As análises sensoriais são realizadas com pessoas voluntárias, portanto, esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná – CAAE: 22206713.9.0000.0102.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da composição química, cor, TBARS e análise sensorial foram submetidos à análise de variância e comparação de médias utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de significância, empregando o módulo ANOVA – Aplicou-se, ainda, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis que é semelhante à ANOVA, para o caso da não existência de uma das premissas (Gaussianidade e homocedasticidade). As premissas básicas do teste “t” foram verificadas aplicando-se o teste da correlação (Manual do software MINITAB) para a Gaussianidade em cada nível do par e os testes F e de Levene para a homocedasticidade do software MINITAB (STATSOFT, 1995).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DE BIXINA

A sementes frescas apresentaram umidade média de  $73,48\% \pm 2,035$ , porém, após a desidratação esses valores foram reduzidos a  $4,8\% \pm 0,6$ . Utilizando o solvente hexano obteve-se o extrato oleoso rendendo 6,59%, em um período de 8 horas, superando o valor encontrado por Costa (2007) que obteve rendimento 5,04%. Matos e colaboradores (1992) realizaram a extração de óleo fixo de algumas oleaginosas, dentre elas *B. orellana*, nas mesmas condições experimentais, porém por um período de 2 horas. O rendimento foi de 2,30%, resultado coerente com o encontrado, uma vez que o período de extração citado foi inferior ao utilizado neste trabalho.

Na fração clorofórmica, ainda no momento da extração já se detectava a presença de cristais no fundo do balão. Após o término do processo, essa fração foi filtrada em funil de Buchner, obteve-se um rendimento 5,07% de cristais, superior ao encontrado por Costa (2007) 2,30%, esta diferença pode ser atribuída às diferentes variedades de *Bixa orellana* L., esses cristais se apresentaram brilhantes de coloração vermelho-púrpura, após 4 horas na estufa a 50°C foram armazenados em um frasco âmbar e conservados sob refrigeração. Análises realizadas anteriormente demonstram que esses cristais correspondem à bixina, principal constituinte do corante (BARBOSA FILHO *et al.*, 1998; SILVA, 2000; e COSTA, 2007).

Um fator que pode ser observado durante as extrações foi descoloração das sementes durante o processo. Após a extração com hexano, as sementes ainda permaneciam bastante vermelhas e a fração hexânica apresentava coloração vermelho-alaranjada. Posteriormente a fração clorofórmica apresentou cor vermelho intensa, enquanto as sementes após a extração estavam praticamente desprovidas de cor demonstrando o êxito do processo de extração.

### 4.2 IDENTIFICAÇÃO DA BIXINA E SAL DE BIXINA

Os cristais obtidos da fração clorofórmica apresentaram ponto de fusão igual a 195°C, correspondendo ao valor encontrado em estudos para a bixina (SILVA, 2000; OLIVEIRA, 2005; COSTA, 2007).

O espectro da bixina de IV (FIGURA 15) observam-se sinais em 1614  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a banda referente à carbonila ligação  $\text{-C=O}$ , presença de uma banda extensa em 1716.64 característica do grupo funcional éster da bixina, na síntese do sal de bixina pode-se observar uma banda larga na região entre 3000 e 3500 correspondente ao sinal do grupamento ácido  $\text{-COOH}$  aumentando a polaridade da molécula (FIGURA 16), na região 3151.00 notou-se a presença de um grupamento  $\text{-H-C=}$  (alqueno) presente na molécula. Esses grupamentos estão presentes na estrutura química do corante bixina, os mesmo encontrados por Oliveira (2005) e Costa (2007).

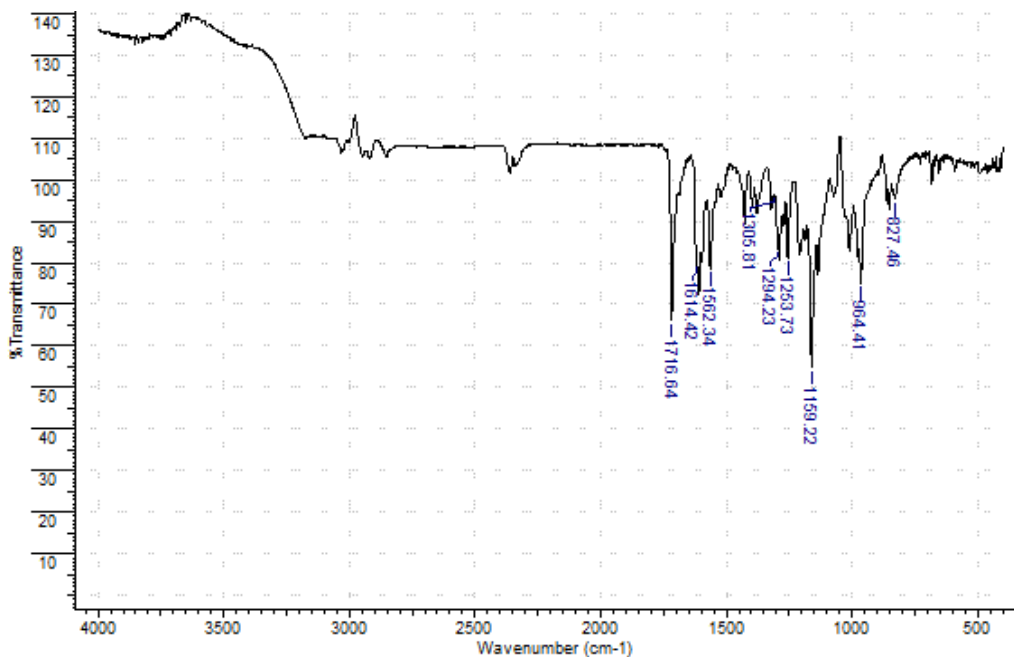


FIGURA 15 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA BIXINA  
 FONTE: A autora (2014)

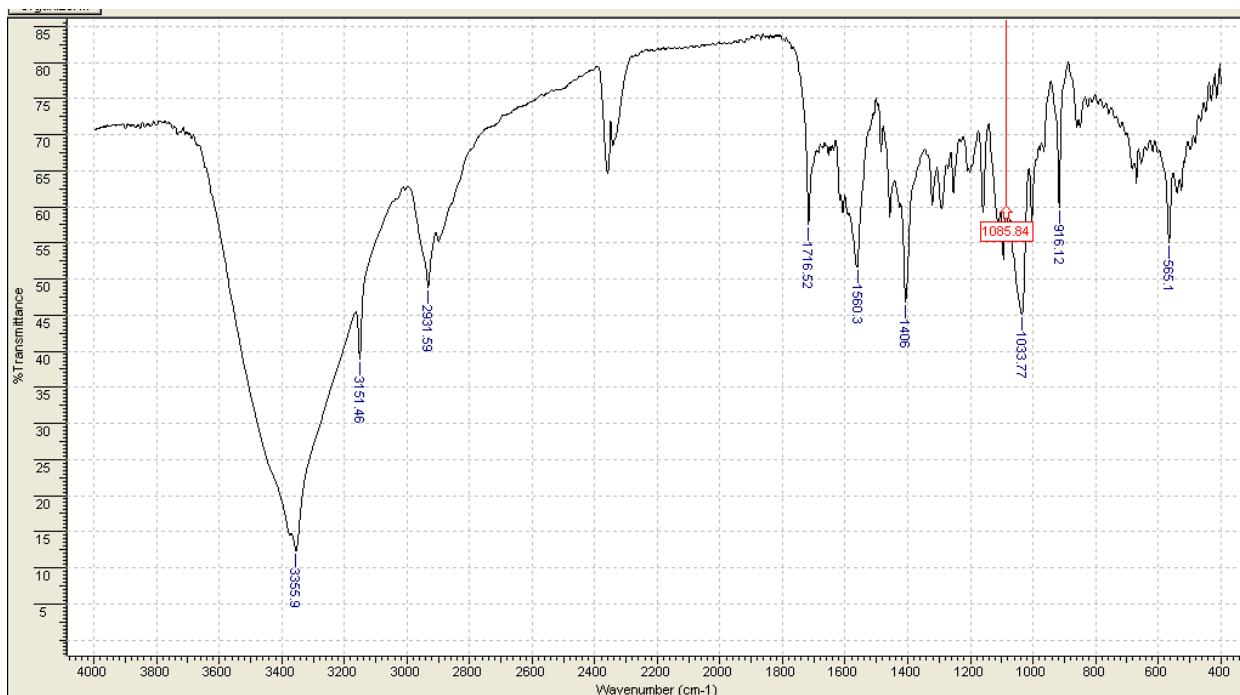


FIGURA 16 - ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DO SAL DE BIXINA  
 FONTE: A autora (2014)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o cristal isolado da fração clorofórmica analisada (FIGURA 17 e TABELA 2) apresentou sinais de deslocamento químico entre 1,92 -1,98 ppm que correspondem ao próton das metilas ligadas aos carbonos vinílicos, um singlete em 3,70 ppm que corresponde a metoxila do grupamento éster e dois pares de dubletos 5,83 / 7,27 e 5,94 / 7,89 ppm atribuídos respectivamente a  $\text{H}_\alpha$  /  $\text{H}_\beta$  aos grupos carboxílicos do ácido livre e do éster. Apresentou multipletos entre 6,45 a 6,87 ppm.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais de deslocamento químico em 166,77 e 167,69 ppm referentes aos carbonos das carbonilas de ácido e éster, respectivamente. Foi verificado ainda sinal de deslocamento em 51,29 ppm referente ao carbono da metoxila do éster. Na região de 117,17 a 148,06 ppm observou-se multiplicidade de sinais correspondentes aos carbonos  $\text{sp}^2$  da cadeia vinílica e na região entre 12,37 - 19,81 ppm os sinais de deslocamento de Carbonos das metilas ligadas aos carbonos vinílicos (FIGURA 18 e TABELA 2).

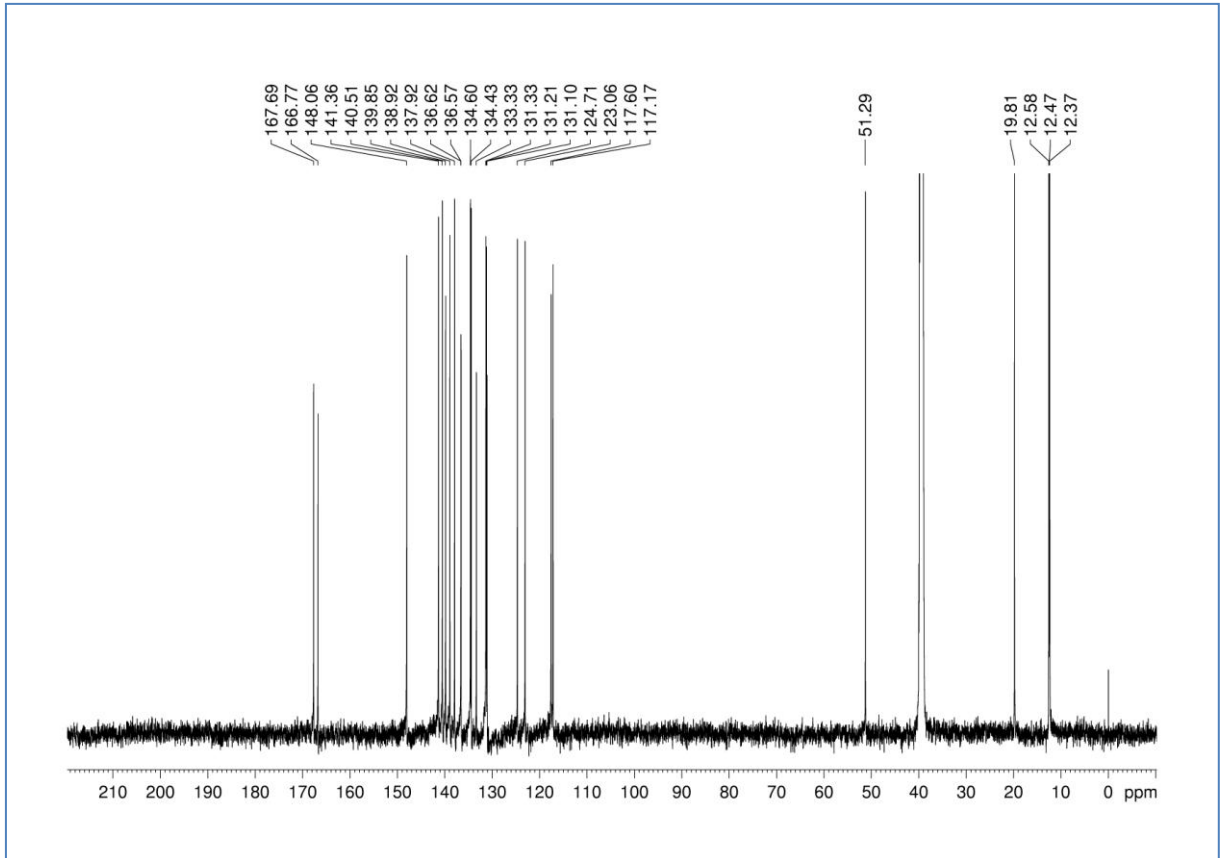


FIGURA 17 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO CRISTAL (600MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  
 FONTE: A autora (2014)

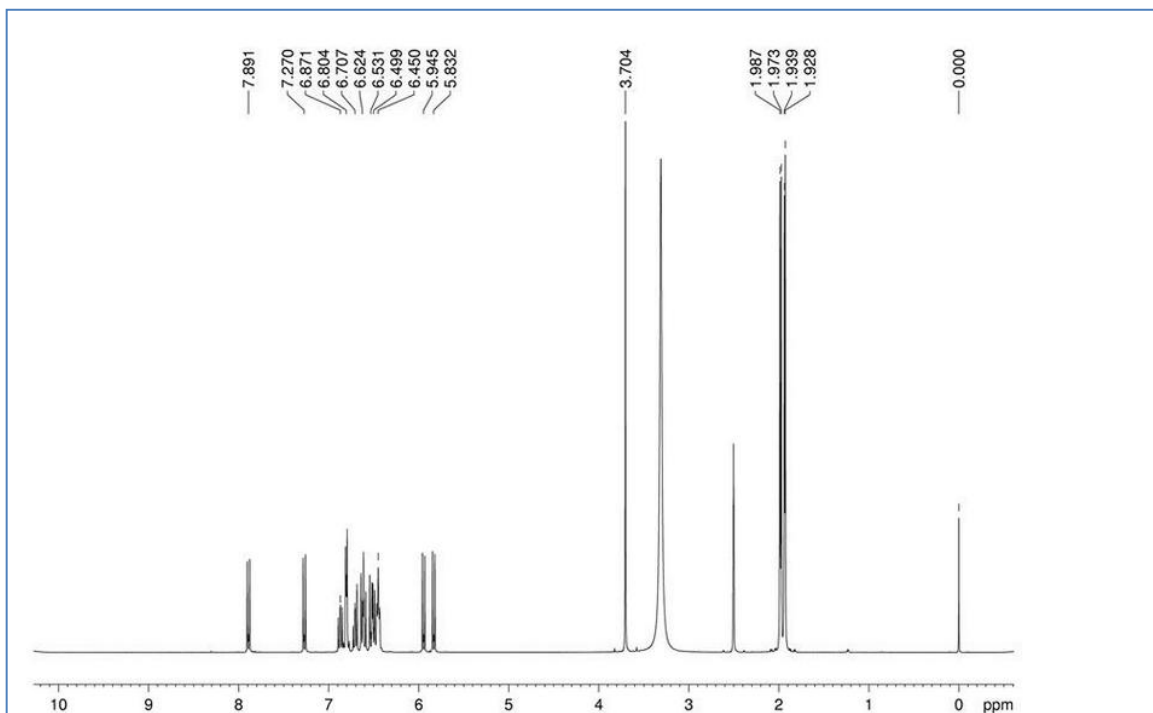


FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO CRISTAL (600MHz,  $\text{DMSO}_{d6}$ )  
 FONTE: A autora (2014)

TABELA 2 - DESLOCAMENTO QUÍMICOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  DO CRISTAL DE BIXINA E CORRELAÇÃO HMQC

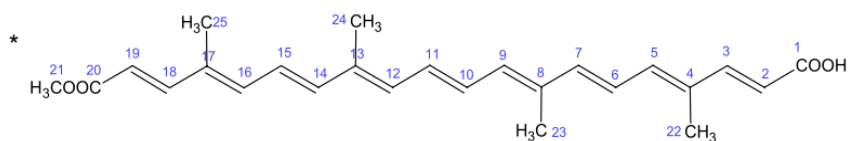
CARBONO*	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^{13}\text{C}^c$	$^{13}\text{C}^d$	HMQC $^d$ $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$	$^1\text{H}^d$
1	167,9	167,8	167,8	167,7		-
2	117,3	117,2	117,2	117,2	5,94	5,83
3	131,2	131,2	131,2	148,1		7,26
4	148,2	148,2	148,2	133,3	7,27	-
5	131,4	131,4	131,4	131,2		6,80
6	140,6	140,6	140,6	140,5		6,53 m
7	138,0	138,0	138,0	137,9		6,49
8	139,0	139,1	139,1	136,6		-
9	134,6	134,5	134,5	134,4		6,45
10	133,4	133,4	133,4	131,3		6,80
11	131,3	131,3	131,3	131,1		6,80
12	134,7	134,7	134,7	134,6		6,45
13	-	136,7	136,7	136,6		-
14	136,7	136,7	136,7	138,9		6,63
15	123,1	123,1	123,1	123,1		6,87
16	124,8	124,8	124,8	124,7		6,70
17	140,0	139,9	139,9	141,3	7,89	
18	141,5	141,4	141,4	139,8		7,89
19	117,7	117,6	117,6	117,6	5,83	5,94
20	166,9	166,9	166,9	166,8		-
21	51,4	51,4	51,4	51,3	3,70	3,7
22	19,9	19,9	19,9	19,8	1,92 – 1,98	1,93
23	13,9	12,6	12,6	12,6	1,92 – 1,98	1,99
24	12,7	12,5	12,5	12,5	1,92 – 1,98	1,97
25	12,6	12,4	12,4	12,4	1,91 – 1,98	1,92

<sup>a</sup> OLIVEIRA, J.S. Purificação de compostos de urucum por processo adsorvivo, Florianópolis, 2005, 185f. Tese (doutorado em Eng<sup>a</sup> Química), UFSC.

<sup>b</sup> COSTA, C.K. Estudo fitoquímico de *Bixa orellana*, Bixacea e aplicação de óleo em formulação cosmética, Curitiba, 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFPR.

<sup>c</sup> GOLIN, Teor de bixina em duas variedades de *Bixa orellana* L. cultivadas no Paraná, 2013

<sup>d</sup> Medidas feitas observando-se o núcleo de  $^1\text{H}$  a 600 MHz e  $^{13}\text{C}$  a 600 MHz, DMSO  $d_6$ .



No presente estudo foi obtido bixina com alto teor de pureza através de cristalização e os cristais formados apresentaram formas geométricas irregulares, alongadas e prismáticas. O método utilizado mostrou ser simples e de baixo custo.

#### 4.2.1 Síntese do sal de bixina e identificação por CLAE

A síntese do sal de bixina com hidróxido de potássio proporcionou maior polaridade para molécula e coloração vermelha intensa atingindo o objetivo esperado, diferente da norbixina com coloração alaranjada, o que poderia influenciar negativamente a aceitação pelo consumidor.

Foi observado nos cromatogramas (FIGURA 15), primeiramente o tempo de retenção da bixina (1), em seguida do sal de bixina (2). Pode-se observar que o sal de bixina obteve tempo de retenção menor que a bixina no cromatograma, podendo ser justificado pela maior polaridade da molécula (RIOS; MERCADANTE, 2004; OLIVEIRA, 2007; NOPPE *et al.*, 2009).

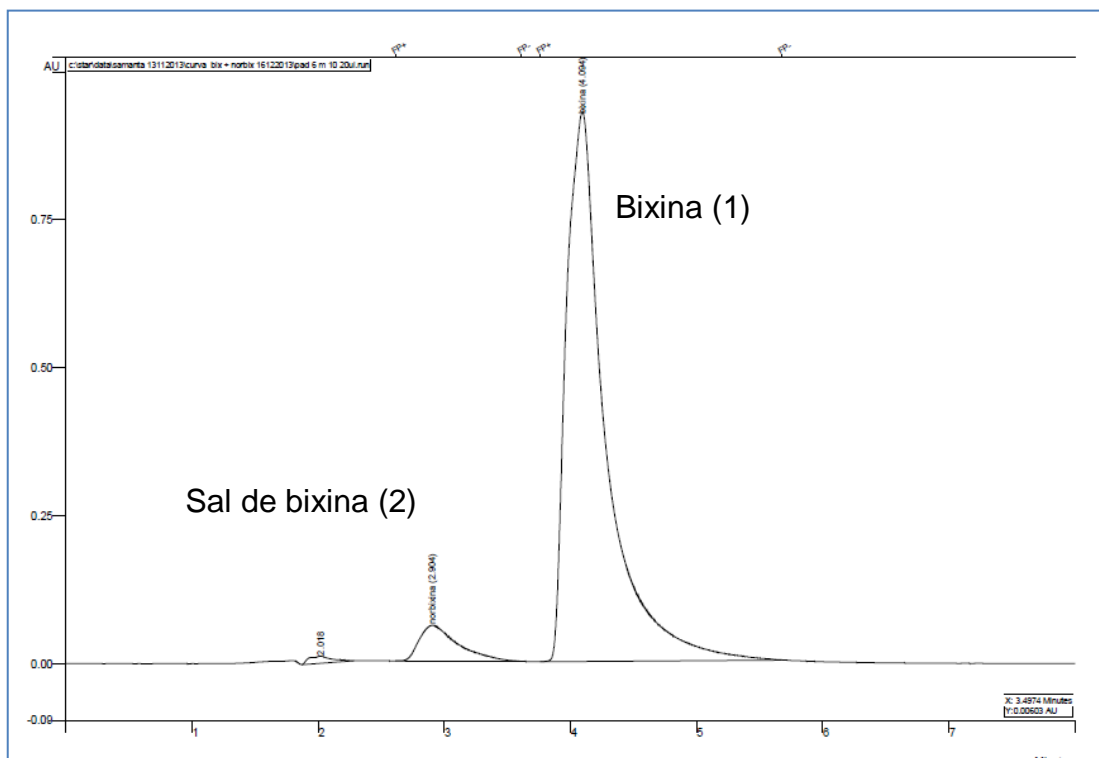


FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS BIXINA (1), SAL DE BIXINA (2)  
FONTE: A autora (2014)

Como esperado, para coluna de fase reversa C18, o sal de bixina eluiu antes que a bixina com um grupo ácido e outro éster. Além disso, o  $\lambda$  máximo do sal de bixina obtido no presente trabalho apresentou um pequeno deslocamento hipsocrômico de 0,99 nm para menor intensidade o sal de bixina quando comparado com a bixina, parecidos com os relatados por Scotter e colaboradores (1998) e Rios (2004), ou seja, de 462.65 para 461.66 nm (FIGURA 16 e 17). A bixina e o sal de bixina apresentaram 99,9% de pureza, observada no UV com detector de arranjo de fotodiodo (ANEXO 4).

Rios e Mercadante (2004) isolaram a norbixina com pureza de 93% e presença de outros compostos, provavelmente isômeros, identificou o 9-cis, 9'-cis-6,6'-diapocaroteno-6,6'-dioato (9'-cis-norbixina) pois apresentou deslocamento hipsocrômico de 5-6 nm em relação à norbixina, diminuição da estrutura fina e aumento da intensidade do pico cis, da mesma forma que a 9-cis-bixina em relação à bixina.

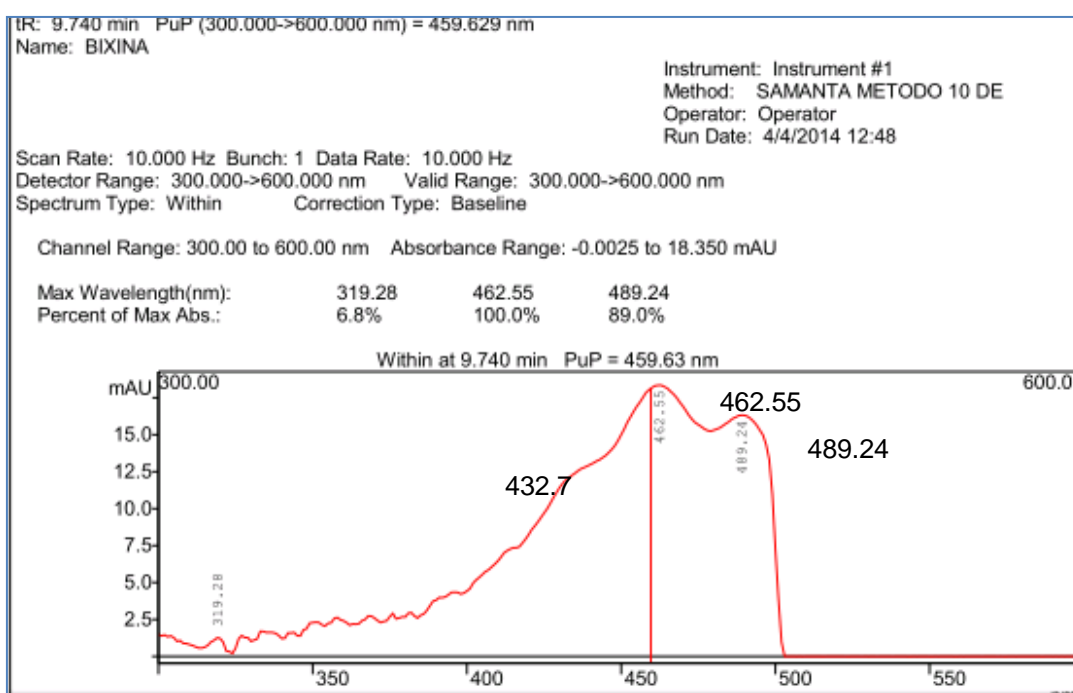


FIGURA 16 – ESPECTRO ULTRAVIOLETA DA BIXINA  
FONTE: A autora (2014)

A cromatografia líquida de alta eficiência apresenta-se como solução para aquelas análises que envolvem riscos de decomposição fotoquímica e por oxidação a que estão sujeitos muitos compostos naturais, situação particularmente observada

na separação de bixina (OLIVEIRA, 2005). Rousseff (1988) desenvolveu e otimizou um processo analítico para determinação de pigmentos de urucum e cúrcuma presentes em corantes alimentícios. Esta técnica analítica reduz os efeitos de decomposição, visto que o tempo decorrido para a separação é reduzido e o processo se desenvolve no interior da coluna, na ausência de luz e em um solvente desgaseificado. A cromatografia líquida, pelas características mencionadas tem sido a técnica mais indicada para análise destes produtos.

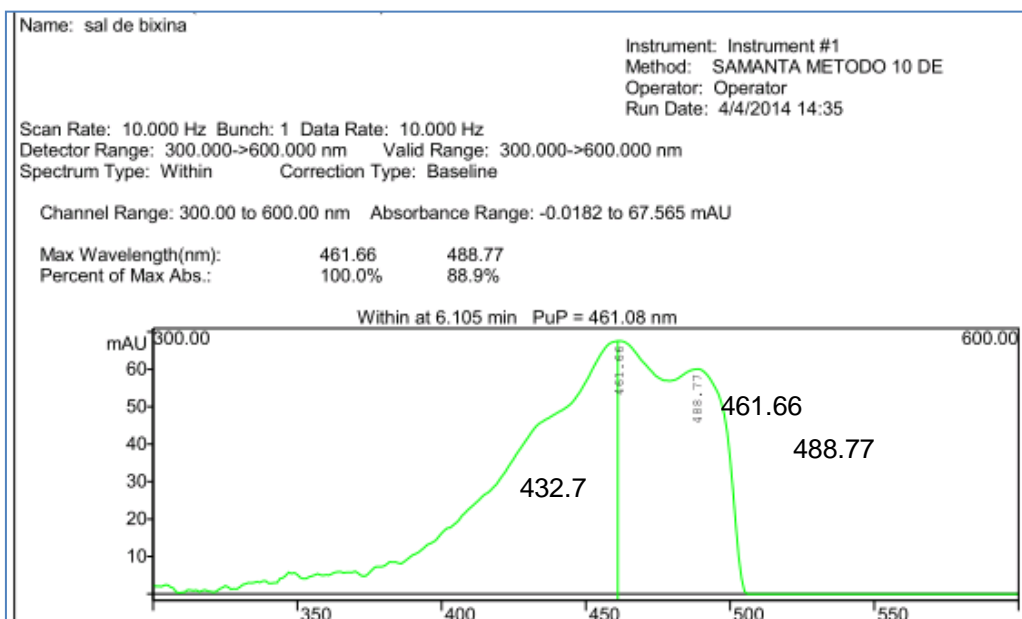


FIGURA 17 – ESPECTRO ULTRAVIOLETA DO SAL DE BIXINA  
FONTE: A autora (2014)

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA-PRIMA CÂRNEA REESTRUTURADA

Os resultados da composição centesimal da amostra de patinho traseiro bovino (*Vastus lateralis*) realizadas com repetição de cinco vezes (TABELA 3) encontrados na matéria-prima cárnea mostram que a umidade encontrada foi 73,84%, proteína 21,02%, lipídios 1,15%, a matéria mineral dos cortes constatou-se que o teor de cinzas 1,093%, coincide com a literatura do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA, 2004; OLIVO; OLIVO, 2006).



TABELA 3 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MATÉRIA PRIMA E PRODUTO REESTRUTURADO

Parâmetros		Matéria prima	Reestruturado
Umidade	Média±DP*	73,84 ± 1,75	73,08 ± 0,57
Proteína	Média±DP*	21,02 ± 1,41	17,97 ± 0,78
Lipídios	Média±DP*	1,15 ± 0,17	1,31 ± 0,20
Cinzas	Média±DP*	1,09 ± 0,07	2,56 ± 0,08
pH	Média±DP*	5,66 ± 0,09	5,79 ± 0,12

FONTE: A autora (2014)

NOTA: \*Valores médios de análises com repetição de cinco vezes ± desvio padrão.

O pH *post mortem* da carne é determinado pela quantidade de ácido láctico produzido a partir do glicogênio durante a glicólise anaeróbica e isso pode ser impedido se o glicogênio for consumido pela fadiga, inanição ou pelo medo do animal antes do abate. Uma vez que o pH é um importante determinante do desenvolvimento microbiano, o pH final da carne é significativo para sua resistência à deterioração. A maior parte das bactérias crescem em pH em torno de 7,0, abaixo de 4,0 ou acima de pH 9,0 encontram resistência para se proliferar, mas o pH para o crescimento bacteriano é determinado pela operação simultânea de outras variáveis além do grau de acidez ou da alcalinidade propriamente dita. Dependendo da adoção de cuidados no período que antecede ao sacrifício (descanso, jejum, estresse) e das transformações subseqüentes, a carne bovina fresca tem seu pH entre 5,3 e 6,5 (PRICE; SCHWEIGERT, 1976). A alteração da carne se dará tanto mais rapidamente quanto mais elevado for o pH (PARDI, 2001). Um pH elevado pode resultar em retenção de água maior e vida de prateleira mais curta do que as carnes de pH "normal" (ABULARACH; ROCHA; FELICIO, 1998).

O pH afeta a estabilidade de muitos corantes naturais da mesma forma que a presença de determinados íons metálicos com reconhecidas características catalíticas, como ferro, alumínio, cobre ou mesmo magnésio, cuja ação catalítica é menor. Estes catalisadores podem aumentar a taxa de decomposição de alguns pigmentos, acarretando a perda de coloração. Os carotenoides particularmente são extremamente susceptíveis a estes efeitos (OLIVEIRA, 2005).

#### 4.4 CONCENTRAÇÃO RESIDUAL DE NITRITO NOS PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS

Ao término do processamento os níveis residuais de nitrito foram reduzidos a aproximadamente 2/3 da concentração original utilizada e após 7 dias de armazenamento congelado (-16°C) os níveis de nitrito já haviam se reduzido aproximadamente à metade. Nas análises realizadas entre o 30° e 60° dias de armazenamento foram verificadas apenas traços do nitrito utilizado (TABELA 4). A concentração de nitrito necessária para as aplicações tecnológicas em produtos cárneos varia entre 30 e 50ppm para o desenvolvimento de cor, entre 20 e 40ppm para desenvolvimento de aroma, entre 80 e 150ppm para o efeito conservante (MÜLLER, 1991) e entre níveis de 20 e 50ppm para o efeito antioxidante (LÜCKE, 2000; TERRA, 2006).

TABELA 4 – NITRITO RESIDUAL NAS AMOSTRAS CÁRNEAS REESTRUTURADAS FORMULADAS COM SAL DE BIXINA

Amostra	Concentração original	Tempo em dias			
		0	7	30	60
		nitrito residual/ppm			
MP	-	-	-	-	-
CTRL	-	-	-	-	-
BIX	-	-	-	-	-
BIXNIT	75ppm	43,25	30,62	ND	ND
NIT	150ppm	101,89	63,29	ND	ND

FONTE: A autora (2014)

NOTA: n=3. Tempo "0" = término do processo. MP= matéria prima; CTRL=controle; BIX =(500ppm sal de bixina); BIXNIT= (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT=(150ppm NaNO<sub>2</sub>).ND = não detectável

Segundo Price e Schweigert (1971), quando o nitrito é adicionado a uma carne nestas condições, a primeira reação que ocorre é a oxidação dos pigmentos para metamioglobina que precisa então ser reduzida e combinada com o óxido nítrico para formar o pigmento final desejado, a nitrosomioglobina. Ainda, segundo estes autores, parece haver várias alternativas nas quais a metamioglobina pode ser convertida ao pigmento curado. A metamioglobina pode combinar-se diretamente

com o óxido nítrico para formar a nitrosometamioglobina, que deve então ser reduzida para formar a nitrosomioglobina.

Em adultos saudáveis, os nitratos e nitritos são absorvidos pelo trato gastrointestinal, sendo o nitrato rapidamente excretado por via renal. Os nitritos, por sua vez, se combinam com a hemoglobina, transformando-a em metahemoglobina, por processo de oxidação do íon ferroso a íon férrico no complexo porfirínico. A metahemoglobina (MetHb) é incapaz de transportar oxigênio, mas a enzima NADH-Metahemoglobina-redutase (NADH-diaforase) presente nos eritrócitos converte-a novamente em hemoglobina. Desta forma, quando os níveis de exposição ao nitrito são baixos, a formação de MetHb é reversível, sendo catalisada pela enzima NADH-Metahemoglobina-redutase. Entretanto, quando o nível de exposição é elevado, o sistema de redução é saturado resultando em aumento da concentração de MetHb no sangue. Níveis de MetHb em torno de 10% podem produzir cianose assintomática, e níveis entre 20 e 30%, podem acarretar o aparecimento de cianose com sinais de hipóxia, astenia, dispnéia, cefaléia, taquicardia e inconsciência. Concentrações em níveis superiores a 50% podem ser fatais. A população infantil, em particular os lactentes com idade inferior a três meses, é a mais susceptível à metahemoglobinemia (WHO, 1978; JAFFÉ, 1981; CORTAS; WAKID. 1991; McKNIGHT *et al.*, 1999; DUARTE, 2010).

Embora a metahemoglobinemia seja, em princípio, um importante problema que acompanha a ingestão dos sais de cura, a formação de nitrosaminas *in vivo* tornou-se um assunto de extrema importância devido ao fato destes compostos possuírem possíveis efeitos carcinogênicos (ARCHER, 2002; ANDRADE, 2004; DUARTE, 2010).

As nitrosaminas requerem ativação metabólica para exercerem sua ação carcinogênica, resultando em compostos que podem alquilar sítios nucleofílicos do DNA, RNA e proteínas (MAGEE e BARNES, 1967). Estudos epidemiológicos sugerem que a excessiva ingestão de agentes nitrosantes e a formação intragástrica de *N*-nitrosaminas possam estar associadas com um alto risco de câncer gástrico, hepático e de esôfago (JÄRGESTAD; SKOG, 2005; DUARTE, 2010). Fatores protetores, tais como adição de ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol aos alimentos são conhecidos como inibidores da formação de compostos *N*-nitrosos (MIRVISH, 1994; TERRY *et al.*, 2001; DUTRA; RATH; GUILLERMO REYES REYES, 2008; DUARTE, 2010). No Brasil, além de não existir um monitoramento para avaliar a presença de

nitrosaminas em alimentos, não existe uma legislação específica (DUTRA; RATH; GUILLERMO REYES REYES, 2008).

#### 4.5 OXIDAÇÃO LIPÍDICA – TESTE DE TBARS

A recuperação do malonaldeído obtida conforme a metodologia no processo de destilação foi 96% e fator de correção encontrado foi de 4,67. Como esperado, os menores níveis de oxidação foram verificados nas amostras contendo nitrito de sódio, durante todo o período de armazenamento as peças cárneas tratadas com sal de cura apresentaram-se aproximadamente entre 2,5 (término do processamento) e 4,3 vezes (60º dia de armazenamento) menos oxidadas em relação ao controle (TABELA 5).

Vários estudos têm demonstrado a reconhecida ação antioxidante do nitrito em produtos cárneos. O tratamento de amostras de produtos cárneos com  $\text{NaNO}_2$  não apenas retarda a oxidação lipídica, como inibe o desenvolvimento do aroma de requeijado (YOUSSEF *et al.*, 2003; ROCHA GARCIA *et al.*, 2003). A utilização de  $\text{NaNO}_2$  no processamento de produtos cárneos foi efetiva no controle da oxidação lipídica, reduzindo os níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), (0,39 mg/kg amostra) para cerca de metade do observado no controle que apresentou 0,72 mg TBARS/kg amostra (YOUSSEF *et al.*, 2003; 2011). Em amostras de presunto de peru avaliadas durante 11 dias de armazenamento a 2°C, o nitrito de sódio em concentrações superiores a 52 ppm, proporcionou significativa redução do valor de TBARS (HASIAK *et al.*, 1984).

Um estudo que avaliou o efeito do tempo de armazenamento (120 dias), concentração de nitrito (50 e 150 ppm), quantidade de gordura (10 e 20%) e tratamento térmico sobre a oxidação de hambúrgueres demonstrou, como esperado, o desenvolvimento da oxidação ao longo do armazenamento, o aumento proporcional da oxidação segundo maior presença de lipídios e a ação antioxidante do nitrito segundo a concentração de uso, no entanto, não foi evidenciado o efeito do calor sobre a rancidez (ARISSETO; POLLONIO, 2005).

TABELA 5 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PRODUTO REESTRUTURADO “CRU”

TTTO	Tempo em dias mg/TBARS/Kg		
	0	30	60
CTRL	2,204±0,141 <sup>aA</sup> (0%)	2,845±0,264 <sup>aB</sup> (0%)	4,166±0,385 <sup>aC</sup> (0%)
BIX	1,303±0,032 <sup>bA</sup> (40,88%)	1,980±0,112 <sup>bB</sup> (30,40%)	2,905±0,187 <sup>bD</sup> (30,27%)
BIXNIT	0,891±0,042 <sup>cA</sup> (59,57%)	1,193±0,036 <sup>cB</sup> (58,07%)	1,359±0,037 <sup>cB</sup> (67,38%)
NIT	0,853±0,064 <sup>cA</sup> (61,30%)	1,003±0,089 <sup>dB</sup> (64,74%)	0,975±0,050 <sup>dB</sup> (75,60%)

FONTE: A autora, (2014)

NOTA: n=8. Tempo “0” = término do processo. MP= matéria prima; CTRL= controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT=(250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT=(150ppm NaNO<sub>2</sub>).

a, b, c, d Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05). A,B,C,D Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05)

(%) Percentual de proteção à oxidação lipídica.

Considerando a necessidade de uso de antioxidante e tentando evitar as atividades cancerígenas, mutagênicas e genotóxicas provenientes das nitrosaminas (WHO, 1978; WALTERS, 1992; ARAÚJO; RODRIGUES, 2008), a substituição de nitrito por antioxidantes naturais são alvo do presente trabalho. Esta proposta tem sido uma alternativa investigada por diversos pesquisadores (ZARRINGHALAMI; HAMIDI-ESFEHANI, 2009; BENEDETTI *et al.*, 2011; CASTRO, 2011; BISWAS; CHATLI; SAHOO, 2012).

O sal de bixina, exceto no início do processo (tempo 0), apresentou efeito antioxidante inferior ao proporcionado pelo nitrito, porém, em relação ao controle, durante todo o período avaliado proporcionou ação antioxidante significativa (p<0,05). Ao final do período de armazenamento, comparando à rancidez no controle, o nitrito (150 ppm) evitou 75% da oxidação, quando este foi parcialmente substituído (75 ppm) pelo sal de bixina (250ppm) esta proteção foi reduzida a aproximadamente 67% (p<0,05), enquanto, a substituição total do nitrito (0 ppm) pelo sal do carotenoide (500 ppm) evitou próximo de 30% da oxidação (p<0,05). A atividade antioxidante do urucum, ainda que não na forma de sal de bixina, foi observada em outros produtos cárneos, como salsichas (MERCADANTE *et al.*, 2010; ZARRINGHALAMI, 2009) e hambúrgueres (CASTRO, 2011).

Extrato de urucum foi estudado sobre o controle da oxidação lipídica em hambúrgueres elaborados com peito de frango (*Pectoralis major*) durante o processamento térmico e armazenamento. A quantificação de malonaldeído (MDA) demonstrou que o uso deste aditivo inibe a oxidação lipídica em amostras grelhadas e armazenadas durante 120 dias a  $-18^{\circ}\text{C}$ . A associação do urucum e vitamina E apresentou um efeito protetor, quando utilizados associados, durante o período de armazenamento desses produtos (FREITAS CASTRO, 2008)

Colorífico produzido com urucum foi utilizado em cortes de frango (0,4g/100g) comparando amostras cruas e grelhadas. O efeito antioxidante observado sugere que a vitamina E, atua juntamente com bixina impedindo a oxidação lipídica. As amostras grelhadas e amostras cruas tratadas com o colorífico não apresentaram resultados diferentes ( $p>0,5$ ) entre si em relação aos níveis de TBARS (CASTRO *et al.*, 2011). No colorífico temos a presença dos tocotrienóis descritos por Costa (2007) atuando como antioxidantes, sendo que colorífico produzido no Brasil é uma mistura da semente inteira triturada juntamente com farinha de fubá e óleo de soja (FRANCO, 2008).

## 4.6 AVALIAÇÃO DA COR

### 4.6.1 Efeito da substituição de nitrito por sal de bixina sobre a cor em produtos reestruturados

A avaliação da luminosidade ( $L^*$ ) nos produtos cárneos reestruturados frescos, de forma geral, demonstrou que a presença do sal de bixina reduz a luminosidade das amostras (TABELA 6). A substituição total (BIX) ou parcial do nitrito (BIX/NIT) proporcionou produtos menos claros quando comparados ao controle ou formulação contendo apenas nitrito (NIT). O tempo de armazenamento também promove a redução da luminosidade nas amostras, em praticamente todos os tratamentos houve significativa redução nos valores de ( $L^*$ ) durante os 30 primeiros dias iniciais, seguindo-se pela estabilização deste parâmetro.

TABELA 6 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A LUMINOSIDADE (L\*) EM CARNES REESTRUTURADAS "CRUAS"

	Tempo dias		
	0	30	60
CTRL	40,110(±0,549) <sup>ABab</sup>	34,341(±0,961) <sup>Ab</sup>	35,185(±1,889) <sup>Ab</sup>
BIX	36,025(±2,713) <sup>BCc</sup>	31,166(±1,748) <sup>Bb</sup>	31,763(±0,951) <sup>Bb</sup>
BIXNIT	38,654(±2,908) <sup>Cbc</sup>	30,770(±1,031) <sup>Bb</sup>	31,087(±1,532) <sup>Bb</sup>
NIT	41,868(±1,816) <sup>Aa</sup>	35,946(±1,619) <sup>Ab</sup>	36,313(±1,932) <sup>Ab</sup>

FONTE: A autora, (2014)

NOTA: n=8. Tempo "0" = término do processo. MP = matéria prima; CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>).

A - D Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

a - d Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

Nas amostras reestruturadas grelhadas as amostras CTRL e NIT mostraram-se mais impactante à luminosidade (L\*) quando comparada aos sais de bixina. Durante os 60 dias de armazenamento, os menores valores de (L\*) foram verificadas nas amostras onde houve substituição parcial (BIXNIT) e substituição total (BIX) do nitrito, inferior inclusive ao observado no controle. Houve significativa redução da luminosidade durante o armazenamento indicando o escurecimento das amostras, situação acompanhada do desenvolvimento da oxidação em todas as amostras (item 4.5). Nas amostras formuladas, sem a presença de bixina (CTRL e NIT) as diferenças foram observadas já após 30 dias de armazenamento (TABELA 7).

TABELA 7 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A LUMINOSIDADE (L\*) EM CARNES REESTRUTURADAS "GRELHADAS"

	Tempo dias		
	0	30	60
CTRL	44,819(±5,795) <sup>Aa</sup>	39,102(±2,143) <sup>Ab</sup>	39,196(±2,067) <sup>Ab</sup>
BIX	37,586(±1,436) <sup>Ba</sup>	34,784(±1,021) <sup>Bab</sup>	35,985(±2,092) <sup>Bb</sup>
BIXNIT	40,306(±2,813) <sup>ABa</sup>	38,195(±1,826) <sup>Aa</sup>	38,674(±1,840) <sup>Aa</sup>
NIT	44,277(±2,902) <sup>Aa</sup>	38,797(±0,417) <sup>Ab</sup>	39,229(±1,150) <sup>Ab</sup>

FONTE: A autora, (2014)

NOTA: n=8. Tempo "0" = término do processo. MP = matéria prima; CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>).

A - D Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

a - d Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

Estudo avaliando a cor de amostras de carne ovina embaladas a vácuo não identificou variações significativas nos valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  ( $p>0,05$ ) durante os 28 dias de armazenamento (FERNANDES *et al.*, 2012). Por ser o vácuo um parâmetro de controle para rancidez, verifica-se uma potencial relação entre o escurecimento das amostras e o desenvolvimento da oxidação de lipídios e dos pigmentos responsáveis pela cor nos produtos cárneos.

De forma complementar, o uso de condições que minimizam a oxidação, como frio e antioxidante, promove estabilidade dos parâmetros de cor. Pesquisas realizadas com músculos *Longissimus lumborum* de cordeiros suplementados com vitamina E demonstraram que os parâmetros de cor não foram afetados durante 12 dias de armazenamento a 4°C (STROHECKER *et al.*, 1997).

Amostras contendo apenas (NIT) apresentaram os menores valores de  $a^*$ , durante o armazenamento. A cor vermelha se mostrou inferior inclusive ao controle (TABELA 8). O nitrito de sódio não é um corante adequado para produtos cárneos frescos, a ligação do NO provido pelo nitrito à mioglobina fornece a cor vermelha característica dos produtos cárneos, no entanto, esta reação é precedida pela oxidação do ferro presente no anel porfirínico, uma alteração que promove o escurecimento das carnes (RAMÍREZ *et al.*, 2004). Tratamentos como salga ou cocção favorecem a interação da mioglobina com o nitrito e cor vermelha, no entanto, em produtos frescos persiste a cor marrom. O uso combinado de nitrito e antioxidantes como o eritorbato de sódio também demonstrou efetivo para promover aumento do parâmetro  $a^*$  em produtos cárneos (TRINDADE *et al.*, 2008)

A substituição do nitrito de sódio por sal de bixina favoreceu a cor vermelha nas amostras cárneas cruas. Amostras contendo bixina apresentaram elevação do parâmetro  $a^*$  conforme a maior concentração utilizada desse sal (BIX>BIXNIT) e não houve redução dessa coloração durante os 60 dias de avaliação (TABELA 8). Em relação ao controle, as amostras contendo sal de bixina apresentaram praticamente o dobro do parâmetro  $a^*$  durante toda vida de prateleira. No 60º dia de armazenamento foi verificado o valor 8,24 de  $a^*$  para CTRL, enquanto os tratamentos BIX e BIXNIT alcançavam médias 16,66 e 15,51, respectivamente, demonstrando a efetividade e estabilidade da bixina como corante cárneo.



TABELA 8 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A COR VERMELHA (a\*) EM CARNES REESTRUTURADAS "CRUAS"

	Tempo dias		
	0	30	60
CTRL	7,708(±0,158) <sup>Aa</sup>	8,177(±0,590) <sup>Aa</sup>	8,240(±0,482) <sup>Aa</sup>
BIX	15,778(±1,682) <sup>Ba</sup>	17,143(±1,643) <sup>Ba</sup>	16,663(±1,144) <sup>Ba</sup>
BIXNIT	12,999(±1,637) <sup>Ca</sup>	15,565(±0,855) <sup>Cb</sup>	15,508(±1,155) <sup>Bb</sup>
NIT	5,922(±0,418) <sup>Da</sup>	6,949(±0,525) <sup>Ab</sup>	7,215(±1,079) <sup>Ab</sup>

FONTES: A autora, (2014)

NOTA: n=8. Tempo "0" = término do processo. CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>).

A - D Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

a - d Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

Diferente deste estudo onde se isolou a bixina e se procedeu a conversão em um sal, Zarringhalami e colaboradores (2009) avaliaram a estabilidade da cor em salsichas, formuladas com 55% e 70% de carne, e variáveis concentrações de nitrito e pó de urucum (1% norbixina). As amostras foram mantidas sob refrigeração a 4 °C por 2, 10, 20 e 30 dias. Observou-se que a adição de urucum em salsichas, seja com 55% ou 70% de carne, proporcionou aumento dos atributos de cor amarelo b\* e vermelho a\*. Os resultados indicam que o urucum pode ser um possível substituto do nitrito quando o objetivo é tornar a coloração do produto mais intensa ou ainda para minimizar os níveis de nitrito e conseqüente formação de nitrosaminas. Os resultados demonstraram ainda a estabilidade da coloração vermelha atribuída pelo urucum por pelo menos 30 dias de armazenamento, conforme foi observado por Chaudry (2003), em que o urucum se mostrou estável frente ao calor, luz e oxidação de matrizes alimentares constituídas de carboidratos ou proteínas.

Nas amostras grelhadas, a presença do sal de bixina novamente favoreceu o desenvolvimento da coloração vermelha não sendo verificadas reduções significativas entre o início e término do tempo de prateleira (TABELA 9). No entanto, o calor favorece a interação entre os derivados do nitrito e mioglobina e, diferente do produto frescal, também promove cor vermelha ainda que inferior (p<0,05) ao sal de bixina. No início do armazenamento, enquanto tratamento BIX apresentou média próxima a 17,0, NIT manteve-se em 10,4 aproximadamente.

O urucum é comumente utilizado como extrato aquoso ou pó obtido de sementes e se caracteriza pela presença de norbixina, um pigmento que encontra solubilidade em água e apresenta coloração alaranjada (KELLY, 1996; MERCADANTE *et al.*, 1997; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001; RIOS; MERCADANTE,

2004; OLIVEIRA, 2005). A atuação dos urucum e seus derivados como corante é prevista inclusive pela legislação (BRASIL, 1998), no entanto, são aplicações diferentes do objetivo deste trabalho onde se investiga o isolamento da bixina, sua conversão em sal e conseqüente solubilidade em água e capacidade de atuar como antioxidante e corante vermelho.

TABELA 9- EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A COR VERMELHA (a\*) EM CARNES REESTRUTURADAS "GRELHADAS"

	Tempo dias		
	0	30	60
CTRL	5,306(±0,823) <sup>Aa</sup>	5,942(±0,705) <sup>Aa</sup>	6,095(±0,615) <sup>Aa</sup>
BIX	15,561(±2,333) <sup>Ba</sup>	14,388(±1,657) <sup>BCa</sup>	15,138(±1,455) <sup>Ba</sup>
BIXNIT	17,061(±2,026) <sup>Ba</sup>	15,683(±2,144) <sup>Ca</sup>	15,761(±2,193) <sup>Ba</sup>
NIT	10,381(±0,763) <sup>Ca</sup>	13,124(±1,235) <sup>Bb</sup>	12,593(±1,026) <sup>Cb</sup>

FONTE: A autora, (2014)

NOTA: n=8. Tempo "0" = término do processo. CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>).

A - D Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

a - d Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

O sal de bixina além de prover a cor vermelha também se mostrou promotor da cor amarela em amostras cruas (TABELA 10). Durante o período de armazenamento as amostras contendo bixina apresentaram valores maiores para b\* quando comparadas ao tratamento NIT ou CTRL e se verificou a estabilidade da cor provida pelo sal de bixina durante os 60 dias de armazenamento.

TABELA 10 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A COR AMARELA (b\*) EM CARNES REESTRUTURADAS "CRUAS"

	Tempo dias		
	0	30	60
CTRL	7,894(±0,307) <sup>Aa</sup>	10,094(±0,503) <sup>Ab</sup>	10,385(±0,549) <sup>Ab</sup>
BIX	11,710(±2,014) <sup>Ba</sup>	14,290(±1,656) <sup>Bb</sup>	13,408(±0,635) <sup>Bab</sup>
BIXNIT	13,356(±2,641) <sup>Ba</sup>	18,375(±1,204) <sup>Cb</sup>	17,963(±1,591) <sup>Cb</sup>
NIT	8,765(±0,621) <sup>Aa</sup>	10,709(±1,023) <sup>Ab</sup>	10,191(±0,577) <sup>Ab</sup>

FONTE: A autora, (2014)

NOTA: n=8. Tempo "0" = término do processo. MP= matéria prima; CTRL=controle; BIX =(500ppm sal de bixina); BIXNIT=(250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT =(150ppm NaNO<sub>2</sub>).

A - D Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

a - d Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% (p<0,05).

Em relação ao parâmetro  $b^*$  das amostras grelhadas, no início do armazenamento enquanto as amostras contendo bixina (BIX ou BIXNIT) apresentavam média próxima a 22 para esse parâmetro, o CTRL ou NIT limitava-se a valores próximos a 11, indicando uma menor tendência ao amarelo. Novamente o sal de bixina se mostrou estável durante o período de armazenamento e novamente, em nenhum tratamento se verificou redução da coloração amarela durante os 60 dias de armazenamento (TABELA 11).

TABELA 11 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO POR SAL DE BIXINA SOBRE A COR AMARELA ( $b^*$ ) EM CARNES REESTRUTURADAS "GRELHADAS"

	Tempo dias		
	0	30	60
CTRL	11,761( $\pm 0,773$ ) <sup>Aa</sup>	11,170( $\pm 0,941$ ) <sup>Aa</sup>	11,501( $\pm 0,978$ ) <sup>Aa</sup>
BIX	22,821( $\pm 2,341$ ) <sup>Ba</sup>	17,174( $\pm 2,139$ ) <sup>Bb</sup>	18,370( $\pm 2,621$ ) <sup>Bb</sup>
BIXNIT	21,463( $\pm 1,980$ ) <sup>Ba</sup>	17,479( $\pm 0,973$ ) <sup>Bb</sup>	17,442( $\pm 1,152$ ) <sup>Bb</sup>
NIT	11,254( $\pm 0,499$ ) <sup>Aa</sup>	11,261( $\pm 0,399$ ) <sup>Aa</sup>	11,400( $\pm 0,555$ ) <sup>Aa</sup>

FONTE: A autora, (2014)

NOTA: n=8. Tempo "0" = término do processo. CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>).

A - D Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

a - d Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa em nível de 5% ( $p < 0,05$ ).

Uma das grandes preocupações que acompanham os aditivos naturais refere-se à instabilidade durante o período de armazenamento. A avaliação da estabilidade de cor em salsichas demonstrou que os pigmentos naturais zeaxantina, norbixina, caroteno e licopeno após 45 dias de armazenamento a 4°C, apresentaram perda da coloração vermelha devido à suscetibilidade à ação oxidante do oxigênio. No entanto, em teste sensorial, essa alteração de cor não foi identificada, recebendo a observação de "muito agradável" por panelistas, mesmo após 45 dias de armazenamento a 4 °C (MERCADANTE, 2010).

O efeito antioxidante da vitamina E e o uso de embalagens com várias condições de atmosfera modificada foram comparados quanto a estabilidade da cor em produtos cárneos congelados durante 18 dias. A redução das concentrações de oxigênio e a presença de vitamina E foram efetivos para preservar a cor dos produtos cárneos durante o armazenamento (FREITAS CASTRO, 2008). Sant'Anna e colaboradores (2013), em uma revisão sobre pigmentos naturais em alimentos, sugerem que o monitoramento de cores poderia ser uma abordagem útil para o

controle em tempo real da qualidade das unções tecnológicas desempenhadas por pigmentos naturais (NASSU *et al.*, 2012).

## 4.7 ANÁLISE SENSORIAL VISUAL

### 4.7.1 Testes de ordenação de preferência

A análise sensorial visual do produto cru demonstrou que, durante o período de armazenamento amostras contendo apenas nitrito de sódio (NIT), foram menos aceitas ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao controle ou tratamentos com sal de bixina. Ao término do processo, nas amostras apresentadas cruas, NIT (47) foi superado por BIX (75) ou BIXNIT (91) e inclusive por CTRL (97). Ao término do período avaliado, este comportamento foi mantido e novamente NIT (45) foi preterido ( $p < 0,05$ ) em relação à BIX (83), BIXNIT (80) ou CTRL (82) (TABELA 12).

Amostras cárneas frescas contendo nitrito apresentam coloração marrom devido à oxidação do ferro ao estado férrico ( $Fe^{3+}$ ). Quando aproximadamente 50% da mioglobina encontram-se na forma de metamioglobina, a cor da carne torna-se inaceitável para a maioria dos consumidores (RICKERT *et al.*, 1957; YOUSSEF *et al.*, 2003). Amostras cruas formuladas apenas com nitrito (NIT) apresentaram os menores valores de preferência e também menores ( $p < 0,05$ ) intensidade da cor vermelha (parâmetro  $a^*$ ) quando comparadas aos tratamentos com sal de bixina (TABELAS 8 e 9).

TABELA 12 - PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES PELA COR DE PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS “CRUS” COM SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA

	Tempo dias		
	0	30	60
CTRL	97abc	96ab	82abc
BIX	91bc	85bc	83bc
BIXNIT	75c	70cd	80c
NIT	47d	49d	45d

FONTE: A autora (2014)

NOTA: n=30. Tempo “0” = término do processo. CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm  $NaNO_2$ ); NIT = (150ppm  $NaNO_2$ ).

a, b, c, d Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% ( $p < 0,05$ ). As amostras onde a diferença entre as somatórias for maior que 26 (continua)

apresentam entre si diferença estatística em nível de 5% de significância. As amostras onde a diferença entre as somatórias for maior que 32 apresentam entre si diferença estatística em nível de 1% de significância.

A análise sensorial visual das amostras grelhadas (TABELA 13) demonstrou que amostras tratadas com nitrito de sódio foram menos aceitas pelo consumidor ( $p < 0,05$ ). Enquanto a aceitação de NIT variou de 48 a 51, durante o armazenamento, para BIX e BIXNIT estes valores variam de 88 a 91 e 66 a 91, respectivamente. No produto grelhado, a cor provida pelo nitrito novamente não satisfaz o consumidores, porém, diferente do produto frescal (onde o sal de cura acentua a indesejável cor marrom), quando aquecidas essas amostras adquirem cor rosa apreciável em produtos cárneos como mortadela ou salsichas, mas inadequada para reestruturados como hambúrgueres. A avaliação da cor das amostras NIT demonstra que o aquecimento promove aumento do parâmetro de cor vermelha (TABELAS 8 e 9).

TABELA 13 - PREFERÊNCIA DOS CONSUMIDORES PELA COR DE PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS "GRELHADOS" COM SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA

	Tempo dias		
	0	30	60
CTRL	80abc	109 <sup>a</sup>	85ab
BIX	91abc	79b	88ab
BIXNIT	91abc	68bc	66bc
NIT	48d	44c	51c

FONTE: A autora (2014)

NOTA: n=30. Tempo "0" = término do processo. CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub>); NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>).

a, b, c, d Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em nível de 5% ( $p < 0,05$ ). As amostras onde a diferença entre as somatórias for maior que 26 apresentam entre si diferença estatística em nível de 5% de significância. As amostras onde a diferença entre as somatórias for maior que 32 apresentam entre si diferença estatística em nível de 1% de significância.

No processamento da maioria dos produtos curados, como salsichas e presuntos, durante a trituração da massa cárnea, ocorrem incorporação de ar, promovendo a oxigenação dos tecidos e, portanto, a oximioglobina estará predominantemente presente no momento da adição dos ingredientes para cura. Inicialmente, a oximioglobina e a mioglobina são oxidadas à metamioglobina pela ação do nitrito. Subseqüentemente, esta reage com óxido nítrico formando o complexo nitrosilmetamioglobina. A redução da nitrosilmetamioglobina, promovida

pela ação de enzimas redutoras, agentes redutores, como ascorbato de potássio, ou grupos sulfidrílicos, liberados durante o tratamento térmico, ou a reação direta da mioglobina com óxido nítrico, dará origem a nitrosilmioglobina (FOX; ACKERMAN,1968; KOIZUMI; BROWN, 1971; FARIA *et al.*, 2001; YOUSSEF *et al.*, 2003).

#### 4.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, ANVISA/MS, preconiza a tolerância para produtos cárneos os seguintes parâmetros: Clostrídio sulfito redutor  $3,0 \times 10^3$  UFC/g, Estafilococos coagulase positiva  $5,0 \times 10^3$  UFC/g, Coliforme a 45°C  $5,0 \times 10^3$  NMP/g, *Salmonella* spp. ausência em 25g. Os resultados das análises microbiológicas da matéria prima e dos quatro tratamentos são apresentados nas tabelas 14, 15 e 16.

A matéria prima (MP) (TABELA 15) que apresentou contaminação de Clostrídios sulfito redutores na ordem de  $3 \times 10$  UFC/g, bem como a contagem de coliformes a 45°C com 43 NMP/g, em relação aos indicadores estafilococos coagulase positiva, foi detectado limite inferior ao método de detecção. A MP não apresentou contaminação com *Salmonella* em 25g da amostra analisada. Pelos parâmetros avaliados conclui-se que a MP é de boa procedência sobre o aspecto microbiológico. Em relação aos tratamentos observou-se que nos tratamentos a contaminação por Clostrídios sulfito redutores permaneceu na mesma ordem de 10 UFC/g. A contagem de coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positiva em todos os tratamentos foi abaixo dos limites de detecção indicando as boas práticas de manipulação no processamento da carne.

Estes resultados diferem dos encontrados por Ferreira e Simm (2012) onde das seis amostras analisadas, apenas uma amostra de carne moída fresca apresentou contaminação abaixo do número máximo, as amostras restantes todas apresentaram contagem para coliformes a 45°C superior ao estabelecido pela RDC 12 (BRASIL, 2001).

TABELA 14 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO EM PRODUTOS CÁRNEOS REESTRUTURADOS CRUS ARMAZENADOS “TEMPO 0” APÓS PROCESSAMENTO

Amostra	Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	Estafilococos Coagulase positiva (UFC/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)
MP	3,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	43	Ausência
CTRL	1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	9	Ausência
BIX	2,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	93	Ausência
BIXNIT	2,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	15	Ausência
NIT	3,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	43	Ausência

FONTE: A autora (2014)

NOTA: MP = matéria prima; CTRL = controle; BIX (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub> ; NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>)..RDC 12 de 02/01/2001 ANVISA/Ministério da Saúde. Clostrídios sulfito redutores 3,0x10<sup>3</sup> UFC/g Estafilococos coagulase positiva 5,0x10<sup>3</sup> UFC/g. Coliformes a 45°C 5,0x10<sup>3</sup> NMP/g *Salmonella* spp ausência em 25 g.

Em estudo com bovinos foi encontrado número de coliformes fecais, respectivamente, de 4,0 UFC/g e <3,0 UFC/g para as amostras submetidas à maturação por 9 dias e 14 dias. Para estafilococos coagulase posita encontrou-se <1,0 x 10<sup>2</sup> UFC/g (PUGA; CONTRERAS; TURNBULL, 1999). Millette e colaboradores (2007) demonstraram que a concentração de 1000 UI/mL de nisina (uma bacteriocina) foi necessária para reduzir em 1,86 log UFC/cm<sup>2</sup> o nível de estafilococos coagulase positiva em carne moída durante 72 horas de armazenamento.

Xavier e Joele (2004) em estudo realizado em supermercados, açougues e feiras livres na cidade de Belém – PA, analisaram trinta amostras de carne bovina em diversos cortes e encontraram a presença de *Salmonella* spp. em uma amostra. Ferreira e Simm (2012) em seu estudo com carne moída em Minas Gerais, observaram que das seis amostras de carne analisadas, uma amostra de carne moída na hora da aquisição apresentou presença de *Salmonella* spp., demonstrando inadequação ao consumo. Por outro lado, Ferreira (2008), analisou quarenta amostras de carne moída coletadas em açougues e supermercados do município de Uberlândia/MG, nas quais não foi detectada a presença do micro-organismo *Salmonella* spp.

A contaminação das carcaças de bovinos com estafilococos coagulase-positiva (CPS) foi estudada em três matadouros de carne bovina na Austrália. A média encontrada nos três matadouros foi 40% de contaminação, constatou-se que

as mãos dos trabalhadores estavam fortemente contaminadas e foram a provável fonte de contaminação por CPS (DESMARCHELIER *et al.*, 1999).

A contagem de coliformes foi avaliada em todas as 30 amostras de carne *in natura* em Belém - PA, sendo que 86,6% delas situaram-se no intervalo com valores máximos pesquisados (XAVIER E JOELE, 2004). Ao avaliar vinte e quatro amostras de carne bovina moída de dez diferentes estabelecimentos da região sul do Rio Grande do Sul foram encontrados em quatro delas valores acima do permitido para coliformes termotolerantes (DIAS *et al.*, 2008). Pigarro e Santos (2008), avaliando oito amostras de carne moída de dois estabelecimentos diferentes encontraram contagens tanto de coliformes totais quanto de coliformes termotolerantes que variavam de  $<1 \times 10^1$  a  $5 \times 10^4$  UFC/g.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e estafilococos coagulase positiva em nenhuma das amostras analisadas durante todo o período de estocagem congelada avaliado. Os dados são semelhantes aos encontrados por Marchi (2006) que, avaliando amostras de carne moída em Jaboticabal-SP, identificou ausência de *Salmonella* sp. e presença de população de *Escherichia coli* de até  $1 \times 10^2$  UFC/ g em 90% das amostras. Marques (2007) encontrou ausência de *Salmonella* spp. e  $4,0 \times 10$  UFC/ g de *Escherichia coli*, analisando corte comercial de acém utilizado para elaboração de hambúrguer.

Grácia (2011) analisando carne de moída encontrou coliformes a  $45^\circ\text{C} < 3\text{NMP/g}$  na carne de especial,  $2,3 \times 10$  NMP/g na carne de primeira e  $1,1 \times 10^3$  NMP/ g na carne de segunda e ausência de *Salmonella* sp. Em especial, a carne moída oferece maior risco de contaminação, por apresentar maior superfície de contato além de sofrer maior manipulação, carreando microrganismos deteriorantes patogênicos e muitas vezes imperceptíveis ao consumidor (FERREIRA; SIMM, 2012).

Após 30 dias de armazenamento a  $-16^\circ\text{C} \pm 1$  (TABELA 15) foi observado uma contagem de clostrídios sulfito redutores abaixo do limite de detecção indicando que o congelamento não permitiu a viabilidade do micro-organismo. Este fato confirma que temperaturas baixas interferem no crescimento de clostrídios Sulfito Redutores. White e Hall (1984) e Trindade e colaboradores (2008), em seus estudos afirmaram que essa bactéria é altamente sensível ao congelamento (CARPENTER; REDDY; CORNFORTH, 1987; McNEILL; KAKUDA, 1988).



TABELA 15 – EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO EM PRODUTOS CÂRNEOS REESTRUTURADOS CRUS ARMAZENADOS POR 30 DIAS

Amostra	Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)
MP	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	23	Ausência
CTRL	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	9	Ausência
BIX	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	9	Ausência
BIXNIT	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	43	Ausência
NIT	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	23	Ausência

FONTE: A Autora (2014)

NOTA: MP = matéria prima; CTRL = controle; BIX = (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub> ; NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>)..RDC 12 de 02/01/2001. ANVISA/Ministério da Saúde. Clostrídios sulfito redutores 3,0x10<sup>3</sup> UFC/g Estafilococos coagulase positiva 5,0x10<sup>3</sup> UFC/g. Coliformes a 45°C 5,0x10<sup>3</sup> NMP/g *Salmonella* spp ausência em 25 g.

Os micro-organismos são menos ativos a 0°C e mesmo a 2°C, a ponto de se considerar essa faixa como limite capaz de proteger o alimento contra toxinfecções, uma vez que os clostrídios sulfito redutores são inibidos a 2,2°C, e as *Salmonellas* spp. e os estafilococos a 4,4°C (PARDI, 2001; AKHTAR *et al.*, 2009; JALOUSTRE *et al.*, 2011). Em relação aos outros indicadores não ocorreu variação de resultado na análise microbiológica a mesma relação que os clostrídios sulfito redutores e os outros parâmetros permaneceram inalterados.

No tempo de 60 dias (TABELA 16) os resultados microbiológicos permaneceram inalterados quando comparados com o tempo de 30 dias em relação dos indicadores sanitários avaliados.

TABELA 16 - EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DO NITRITO DE SÓDIO POR SAL DE BIXINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO MICROBIANO EM PRODUTOS CÂRNEOS REESTRUTURADOS CRUS ARMAZENADOS POR 60 DIAS

Amostra	Clostrídios sulfito redutores (UFC/g)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (25 g)
MP	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	23	Ausência
CTRL	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	93	Ausência
BIX	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	23	Ausência
BIXNIT	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	9	Ausência
NIT	< 1,0 x 10	< 1,0 x 10 <sup>2</sup>	24	Ausência

FONTE: A autora (2014)

NOTA: MP = matéria prima; CTRL = controle; BIX (500ppm sal de bixina); BIXNIT = (250ppm sal de bixina:75ppm NaNO<sub>2</sub> ; NIT = (150ppm NaNO<sub>2</sub>)). RDC 12 de 02/01/2001 ANVISA/Ministério da Saúde. Clostrídios sulfito redutores 3,0x10<sup>3</sup> UFC/g Estafilococos coagulase positiva 5,0x10<sup>3</sup> UFC/g. Coliformes a 45°C 5,0x10<sup>3</sup> NMP/g *Salmonella* spp ausência em 25 g.

Em três diferentes tratamentos realizados: 1) controle (sem aditivos); 2) adição de 150 ppm de nitrito; e 3) adição de 150 ppm de nitrito e 500 ppm de eritorbato. A avaliação da estabilidade microbiológica da carne mecanicamente separada (CMS), realizada no primeiro e último dia de estocagem, congelada, para coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positiva e clostrídios sulfito redutores, indicou que não houve uma variação significativa nas contagens em função do tratamento utilizado (diferentes aditivos adicionados). Não foi detectada *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras analisadas (TRINDADE *et al.*,2008).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sal de bixina se mostrou uma alternativa viável para prover cor vermelha e ação antioxidante em substituição ao nitrito de sódio, podendo minimizar sua utilização e conferir maior segurança aos produtos cárneos reestruturados. Corantes amarelo-alaranjados obtidos do urucum são uma ferramenta tecnológica conhecida e de uso previsto na legislação. No entanto, o isolamento da bixina e sua conversão em sal proporcionam um aditivo inovador, de cor vermelho-púrpura, ação antioxidante e características hidrofílicas que podem permitir amplas aplicações na indústria alimentícia. Estudos complementares devem ser desenvolvidos para adequar as concentrações utilizadas e condições de processo aos produtos cárneos. A capacidade do sal de bixina inibir a rancidez, se soma a pesquisas que identificaram este comportamento em outros derivados do urucum. Assim, sugere-se que a legislação nacional seja revista e, além da função tecnológica de corante deve ser incluída também a ação antioxidante.

Ainda que o desempenho antioxidante do derivado da bixina não seja tão pronunciado quanto do nitrito, se mostrou eficaz durante toda a vida de prateleira, podendo ser utilizado individualmente ou combinado ao nitrito, minimizando a ingestão do sais de cura.

## REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Portal DBO disponível em <<http://www.portaldbo.com.br/Portal/Conteudo/Noticias/9235,,Abate+de+bovinos+bate+recorde+em+2013.aspx>>. Acesso em 31/03/2014.

ABRAHÃO, W. M., **Método de detecção e ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em queijos comercializados no estado do Paraná.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 2008.

ABULARACH, M. L. S.; ROCHA, C. E.; FELICIO, P.E. de. Características de qualidade do contrafilé (M. L. dorsi) de touros jovens da raça nelore. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 205-210, 1998.

AKHTAR, S.; PAREDES-SABJA, D.; TORRES, J. A.; SARKER, M. R. Strategy to inactivate *Clostridium perfringens* spores in meat products. **Food Microbiology**, v. 26 p.272–277, 2009.

ALBUQUERQUE , M. V., SANTOS , A.; CERQUEIRA, N. T. V., SILVA, J. A. Educação alimentar: Uma proposta de redução de aditivos alimentares. **Revista Química Nova na Escola**, v.34, n.2, 2012.

ALP, E.; AKSU, M. İ. Effects of water extract of *Urtica dioica* L. and modified atmosphere packaging on the shelf life of ground beef. **Meat Science**, v.86, p.468–473, 2010.

ANDRADE, R. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de nitrato, nitrito e N-nitrosaminas em produtos cárneos.** 201f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

ARAÚJO, J. A. **Química de alimentos: teoria e prática**, 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 1999.

ARAÚJO, P.F.,de; RODRIGUES, R. S. Nitrates, nitrites, nitrosaminas and their effects on the human body. *Higiene alimentar*, v.22, n.160, p.54-58, 2008.

ARCHER, D.L. Evidence that ingested Nitrate and Nitrite are beneficial to health. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 5, p. 872-875, 2002.

ARISSETO, A. P.; POLLONIO, M. A. R. Evaluation of the oxidative stability of hamburger calabresa type, formulated with reduced texts of nitrite and different percentages of fat, during frozen storage. **Higiene alimentar**, v.19, p.72-80, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**, 16.ed. Arlington:Ed. AOAC.v.2, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official methods of analysis of the Association of Official Analutical Chemistry**, 16 ed. Washington, 1997.

AUN, M. V., MAFRA, C., PHILIPPI, J. C., KALIL, J., AGONDI, R. C., MOTTA, A. A. . Aditivos em alimentos. **Revista brasileira de alergía e Imunopatologia**, v. 34,n. 5, 2011.

BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5th ed., v.3. John Wiley: New York, 1996.

BARBER, M. S.; HARDISSON, A.; JACKMAN, L. M.; WEEDON, B. C. L Studies in nuclear resonance. Part IV. Stereochemistry of the bixins. **Proceedings of the Chemical Society**, v. 61, p. 1625-1630, 1961.

BEKHIT, A. E. D.; GEESINK, G. H.; ILIAN, M. A.; MORTON, J. D.; BICKERSTAFFE, R. The effects of natural antioxidants on oxidative processes and metmyoglobin educing activity in beef patties. **Food Chemistry**, v.81, p.175–187, 2003.

BENEDETTI, S.; BRUNGERA, A.; RIZZATTI, R.; DICKEL, E.L.; BERTOLIN T.E. Partial replacement of nitrite by antioxidants and its effect on smoked sausage color. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, n.70, p.296-301, 2011.

BISWAS, A.K.; CHATLI, M.K.; SAHOO J. Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. **Food Chemistry**, v.133 p.467–472, 2012.

BORBA, C. M.; OLIVEIRA, V. R.; MONTENEGRO, K. R.; HERTZ, P. F.; VENZKE, J. G. Diferentes processamentos de hambúrguer bovino e de frango. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, Araraquara, v. 24, n. 1, p. 01-07, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento de inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. **Diário Oficial da União [da] República Federativa da União** Rio de Janeiro, 1962.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Métodos Analíticos para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes – LANARA**. Brasília, 1989.

BRASIL. Portaria n. 1004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 20**. (DOU 31/7/2000) Anexo IV. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Almôndega, de Apresuntado, de Fiambre, de Hambúrguer, de Kibe, de Presunto Cozido e de Presunto. **Diário Oficial da União [da] República Federativa da União** Brasília, 2000. Disponível em< <http://www.agricultura.gov.br> r>. Acesso em: jan. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº62 de agosto de 2003 **Diário Oficial da União [da] República Federativa da União..** Brasília, 2003. Disponível em< <http://www.agricultura.gov.br> r>. Acesso em: fev. 2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. II. Métodos Físico-Químicos. Brasília. 1981.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Divisão de Produtos de Origem Animal. **Circular nº 16/DICAR** de 24/01/2000. Brasília, 2000.

BRASIL. RDC 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**; Brasília, DF , de 10 jan. p.12-16, 2001.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC nº 360**, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a Análise de Sementes**. 399f. Brasília: MAPA/ACS, 2009.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Ed. Acribia: Zaragoza, 1991.

BRUNING-FANN, C.S.; KANEENE, J.B. The effects of nitrate, nitrite, and n-nitroso compounds on human health: a review. **Veterinary and Human Toxicology**, v.35, p.521-538, 1993.

CANTOR, K. P. Drinking water and cancer. **Cancer Causes Control**, v. 8, p. 292-308, 1997.

CARPENTER, C. E.; REDDY, D. S. A.; CORNFORTH, D. P. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 549-552, 1987.

CARVALHO, J.L.S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n.4, p. 1031-1035, 2009.

CASSENS, R. G. Use of sodium nitrite in cured meats today. **Food Technology**, v. 49, n. 7, p. 72-80, 1995.

CASSENS, R. G. Composition and safety of cured meats in the USA. **Food Chemistry**, v.59, n.4, p.561-566, 1997.

CASTRO, W. F.; MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 126–131, 2011.

CAYE, L.; FRANÇOIS, P.; SANTOS, M. V.; MEDEIROS, L. M.; PIRES, C. C. Hambúrguer de carne ovina: aceitabilidade do consumidor. In: SEMINÁRIO: Sistemas de Produção Agropecuária - Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2009, Campus Dois Vizinhos. **Anais**. Campus Dois Vizinhos: UFTPR, 2009.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.

CIE. Colorimetry. Recommendations on uniform colour spaces, colour differences equations. Psychometric terms. **Central Bureau of the CIE**, Publication N° 15. 2ed. Vienna: 1986.

CIE. Industrial colour difference evaluation. Publication. **Central Bureau of the CIE**, N°.116. Vienna: 1995.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v. 78, p.90–103, 2008.

CORTAS, N.K.; WAKID, N.W. Pharmacokinetics aspects of inorganic nitrate ingestion in man. **Pharmacology and Toxicology**, v.68, p.192-193, 1991.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1975.

COSTA, C.K. **Estudo fitoquímico de *Bixa orellana*, Bixacea e aplicação de óleo em formulação cosmética**. 98f.Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

COSTA, L. O. **Processamento e diminuição do reprocesso do hambúrguer bovino**.127f. Trabalho de Conclusão (Curso de Graduação) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2004.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p.173, 2000.

DESMARCHELIER, P. M.; HIGGS G. M.; MILLS L.; SULLIVAN A. M.; VANDERLINDE, P. B. Incidence of coagulase positive Staphylococcus on beef carcasses in three Australian abattoirs. **International Journal of Food Microbiology**, v.47 p. 221–229, 1999.

DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO R.C.S. da; COELHO F.J.O.; TEJADA T.S.; SEGATTO M.; TIMM C.D. Qualidade Higiénico-Sanitária de Carne Bovina Moída e de Embutidos Frescos Comercializados no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológicos**, v.75, n.3, p.359-363, 2008.



DJENANE, D.; AÏDER, M.; YANGÜELA, J.; IDIR, L; GÓMEZ, D.; RONCALÉS. P. Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with E. coli O157:H7 and S. aureus during storage at abuse refrigeration temperature. **Meat Science**, v. 92, p.667–674, 2012.

DUARTE, M. T. **Avaliação do teor de nitrito de sódio em linguças do tipo fresco e cozida comercializadas no Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. 86f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

DUTCOSKY, S.D. **Análise Sensorial de Alimentos**. Curitiba: 4 ed Ed. Champagnat, 2013.

DUTRA, C. B.; RATH, S.; GUILLERMO REYES REYES, F. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 1, p. 111-120, 2008.

EATON JW. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.3, p.118, 1991.

ELIAS, M. E. A.; SCHROTH, G.; MACEDO, J. L. V.; MOTA, M. S. S.; D'ANGELO, S. A. Mineral nutrition, growth and yields of annatto trees (*Bixa orellana*) in agroforestry on an Amazonian ferralsol. **Experimental Agriculture**, v. 38, p. 277-289, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). **A cadeia da carne bovina no Brasil**. Dez/2004.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). **Gado de corte: conhecendo a carne que você consome. A carne como alimento 2002**. Versão internet. Disponível em <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/02carnealimento.html>> Acesso em 22/04/2014.

EPAMIG. **Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais**. Março, 2008. Disponível em: <[http://www.epamig.br/index.php?Itemid=68&id=362&option=com\\_content&task=view](http://www.epamig.br/index.php?Itemid=68&id=362&option=com_content&task=view)>. Acesso em: 21 set. 2013.

EVANS, W. C. **Trease and Evans Pharmacognosy**. 13 ed. London: Beillière Tindall, 1992.

FARMER, E. H.  $\alpha$ -Methylenic reactivity in olefinic and polyolefinic systems. **The Journal of the Chemical Society**, v.38, p.348, 1942.

FDA. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 8<sup>th</sup>ed Gaithersburg, 1995.

FERNANDES, R. de P. P.; FREIRE, M. T. de A.; GUERRA, C. C.; CARRER, C. da; BALIEIRO, J. C. de; TRINDADE, M. A. Estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial de carne ovina embalada a vácuo estocada sob refrigeração. **Ciência Rural**, v.42, n.4, abr, 2012.

FERREIRA, Isaura Maria. **Riscos Relacionados à Contaminação Microbiana de Carne Moída Bovina**. 53f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, Uberlândia, 2008.

FERREIRA, R S.; SIMM, E. M. Análise microbiológica da carne moída de um açougue da região central do município de Pará de Minas/MG. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, n.3, p.37 - 61, 2012.

FORMAN, D. A.; AL-DABBAGH, S.; DOLL, R. Nitrates, nitrites and gastric cancer in Great Britain. **Nature**, n. 313, p. 620-625, 1985.

FOX, J. B., JR.; ACKERMAN, S. A. Formation of nitric oxide myoglobin: mechanisms of the reaction with various reductants. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 4, p. 364-370, 1968.

FARIA, J. A. F.; FELÍCIO, P. E.; NEVES, M. A.; ROMANO, M. A. Formação e Estabilidade da Cor de Produtos Cárneos Curados Revisão. **Revista Tecnologia de Carnes**, v.3, n.2, p.16-22, 2001.

FRANÇA FILHO, A. T.; DE MESQUITA, A. J.; DE OLIVEIRA, J. P.; BUENO, C. P.; LOPES, J. H.; COUTO, M. V.; BORGES, N. M. F. Qualidade bacteriológica de meias-carcaças bovinas oriundas de matadouros-frigoríficos do Estado de Goiás habilitados para exportação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 315-325, 2006.

FRANCO, C.F. de O.; FABRI, E. G.; BARREIRO NETO, M.; MANFIOLLI, M. H.; HARDER, M.N.C.; RUCKER, N. C. de A. **Urucum: sistemas de produção para o Brasil**. João Pessoa: Emepa, p.84-89, 2008.

FREITAS CASTRO, W. **Avaliação do efeito protetor do colorífico como antioxidante natural na oxidação lipídica em carne de frango**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Programa em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

GARCIA, C.E.R.. Antioxidantes utilizados na indústria cárnea: quais são os aditivos inibidores da rancidez nos produtos cárneos. **Revista Nacional da Carne**, v.26, n.299, p.36-51, 2002.

GARCIA, C.E.R.; YOUSSEF, E. Y.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M.; FIGUEIREDO, E.; SHIMOKOMAKI, M. Preservation of spent leghorn hen meat by a drying and salting process. **Journal of Applied Poultry Research**, v.12, p.335-340, 2003.

GARCIA, C.E. R.. Bixina e norbixina: os pigmentos do urucum (*Bixa orellana* L.) utilizados na indústria cárnea. **Revista Nacional da Carne**, v.401, p.14-22, 2010.

GARCIA, C. E. R.; BOLOGNESI, V. J.; GASPARI DIAS, J.; MIGUEL, O. G.; COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v. 42, n. 8, p. 1510-1517, 2012.

GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY, P. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.12, p.513-516, 2003.

GOLIN, S. D.; GARCIA, C. E. R.; STRAPASSON, G. C.; WILLE, G. M. F. C.; SANTOS, D. F. B.; BOLOGNESI, V. J.; MIGUEL, O. G.; BARREIRA, S. M. **The antioxidant potential of the Annatto**. In: International of Pharmaceutical Sciences 9<sup>th</sup>. Ribeirão Preto, SP 2013a. Disponível em <<http://www.cifarp.com.br/painel/inc/trabalhos/resumo1958.pdf>>. Acesso em: 27/02/2014.

GOLIN, S. D.; GARCIA, C. E. R.; BARREIRA, S. M. W.; BEDNARCZUK, V. O.; STRAPASSON, G. C.; ZUCHETTO, M.; MIGUEL, O. G. Concentration of bixin in two varieties of *Bixa orellana* L. cultured in Paraná. **Visão Acadêmica**, v. 14, n. 4, p.37-48, 2013b.

GOMES, H. A.; SILVA, E. N. da.; NASCIMENTO, M. R. L do.; FUKUMA, H. T. Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. **Food Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 433-437, 2003.

GRÁCIA, M. A. **Parâmetros indicadores de qualidade de carne moída utilizada em restaurantes de coletividade**. 138 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, p.539, 1978.

HASIAK, R. J.; CHAVES, J.; SEBRANEK, J.; KRAFT, A. A. Effect of sodium nitrite and sodium eritorbate on the chemical, sensory and microbiological properties of water-added turkey ham. **Poultry Science**, v. 63, n. 7, p. 1364-1371, 1984.

HAYES, J.E.; STEPANYAN, V.; ALLEN, P.; O'GRADY, M.N.; KERRY, J.P. Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties. **Meat Science**, v.84, p.613–620, 2010.

HIERRO, E.; GANAN, M.; BARROSO, E.; FERNÁNDEZ, M. Pulsed light treatment for the inactivation of selected pathogens and the shelf-life extension of beef and tuna carpaccio. **International Journal of Food Microbiology**, v.158, p.42–48, 2012.

HIMEDIALABS. Disponível em: <  
<http://www.himedialabs.com/intl/en/products/Dairy/Pathogen-Detection-Salmonella/Triple-Sugar-Iron-Agar-M021>> Acesso em: 05/05/2014.

HUNTER LAB. Measuring Meat Steaks, Fillets, and Patties Using the MiniScan EZ 45/0 LAV. **Hunter Associates Laboratory**, 2008. Disponível em: <<http://www.hunterlab.com/measurementmethods/fish2.html> > Acesso em 03/10/14.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** 4.ed. / 1.ed. digital - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Use of epidemiologic data to measure the impact of food safety control programs. **Food Control**, v.17, p. 825–837, 2006.

IBGE. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.<  
[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/default.shtm)>. Acesso em 20/04/2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária. 2013. Disponível em <  
[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201302\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201302_publ_completa.pdf)>. Acesso em 31/03/2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Abates bovinos, suínos e frangos, aquisição de leite e produção de ovos são recordes em 2013. Disponível em <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&idnoticia=2607&busca=1&t=abates-bovinos-suinos-frangos-aquisicao-leite-producao-ovos-sao-recordes-2013>> Acesso em 31/03/2014.

JAFFÉ, E.E. Methaemoglobinaemia. **Clinics Haematology**, v.10, p. 99-122, 1981.

JALOUSTRE, S.; CORNU, M.; MORELLI, E.; NOËL, V.; DELIGNETTE-MULLER, M.L. Bayesian modeling of *Clostridium perfringens* growth in beef-in-sauce products. **Food Microbiology**, v.28, p. 311-320, 2011.

JÄRGESTAD, M.; SKOG, K. Review: Genotoxicity of heat-processed foods. Mutation Research. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.574, p.156-172, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 8ª ed. São Paulo: Nacional, p. 482-485, 1987.

KANATT, S. R.; CHANDER R.; SHARMA A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, v.107 p.845–852, 2008.

KELLY, D. R. et al. NMR, MS and X-ray crystal structure determination of bixin family of apocarotenoids. **Journal of Chemical Research**, v.10, p. 2637-2645, 1996.

KOIZUMI, C.; BROWN, W. D. Formation of nitric oxide myoglobin by nicotinamide adenine dinucleotides and flavins. **Journal of Food Science**, v. 36, p. 1105-1109, 1971.

LACOMA. Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água. Disponível em: < <http://www.palotina.ufpr.br/lacoma/salmonella.htm> > Acesso em 05/05/2014.

LAVIERI, N.; WILLIAMS, S.K. Effects of packaging systems and fat concentrations on microbiology, sensory and physical properties of ground beef stored at  $4 \pm 1$  °C for 25 days. **Meat Science**, v. 97, p. 534–541, 2014.

LEMOS, A. R. **Caracterização físico-química, bioquímica e avaliação da atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana* L.)**.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008.

LIMBO, S.; UBOLDI, E.; ADOBATI, A.; IAMETTI, S.; BONOMI, F.; MASCHERONI, E.; SANTAGOSTINO, S.; POWERS, T.H.; FRANZETTI, L.; PIERGIOVANNI, L. Shelf life of case-ready beef steaks (*Semi tendinosus* muscle) stored in oxygen-depleted master bag system with oxygen scavengers and CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> modified atmosphere packaging. **Meat Science**, v. 93, p.477–484, 2013.

LÜCKE, F.K. Use of nitrite and nitrate in the manufacture of meat products. **Fleischwirtschaft International**, v.4, p.38-41, 2000.

MAGEE, P.N.; BARNES, J.M. Carcinogenic N-nitroso compounds. **Advances in Cancer Research**, v.10, p.164-246, 1967.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MALDONADO-ROBLEDO, G.; RODRIGUEZ-BUSTAMANTE, E.; SANCHEZ-CONTRERAS, A.; RODRIGUEZ-SONOJA, R.; SANCHEZ, S. ; Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, p. 484, 2003.

MAPA: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. DISPONÍVEL EM: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno/requisitos-sanitarios>. > Acesso em 07/04/2014.

MARCHI, P. G. F. **Estudo comparativo do estado de conservação de carne moída através de métodos microbiológicos e físico-químicos**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. UNESP, Campus Jaboticabal, 2006.

MARIEM, C.; SAMEH, M.; NADHEM, S.; I SOUMAYA, Z.; NAJIBA, Z.; RAOUDHA, E. G. Antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from *Nitrariaretusa* fruits and their applications to meat product preservation. **Chaâbane Industrial Crops and Products**, v. 55 p.295–303, 2014.

MARQUES, J. M. **Elaboração de um produto de carne bovina “tipo Hambúrguer” adicionado de farinha de aveia**. 71 f. Dissertação (Mestrado em

Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A. **Composição do óleo das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.)**. Resumos da 39<sup>a</sup>. Reunião Anual da SBPC, 101.-D. 2.5, 1987.

McNEILL, J.; KAKUDA, Y. Influence of carcass parts and food additives on the oxidative stability of frozen mechanically separated and hand-deboned chicken meat. **Poultry Science**, v. 67, n. 2, p. 270-274, 1988.

McKNIGHT, G.M; DUNCAN, C.W.; LEIFERT, C.; GOLDEN, M.H. Dietary nitrate in man: friend or foe? **British Journal of Nutrition**, v.81, p.349-358, 1999.

MERCADANTE, A.Z.; STECK, A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B; PFANDER, H.; BRITTON, G. Isolation of methyl 9'Z-apo-6'-lycopenoate from *Bixa orellana* L. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1201-1203, 1996.

MERCADANTE, A. Z.; STECK, A.; PFANDER, H. Isolation and structure elucidation of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. **Phytochemistry**, v. 46, p.1379-1383, 1997.

MERCADANTE, A. Z.; CAPITANI, C. D.; DECKER, E. A.; CASTRO, I. A. Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, v. 84, p. 718-726, 2010.

MICHALCZYK, M.; MACURA, R.; TESAROWICZ, I.; BANAS, J. Effect of adding essential oils of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) on the shelf life of ground beef. **Meat Science**, v. 90, p. 842–850, 2012.

MILLETTE, M.; TIEN, C. LE; SMORAGIEWICZ, W.; LACROIX, M. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modiWed alginate Wlms and beads. **Food Control**, v.18, p. 878–884, 2007.

MISODOR. Disponível em: <http://www.misodor.com/SALMONELOSE.php> . Acesso em 05/05/2014.

MITACEK, E.J.; BRUNNEMANN, K.D.; SUTTAJIT, M.; MARTIN, N.; LIMSILA, T.; OHSHIMA, H.; CAPLAN, L.S. Exposure to N-nitroso compounds in a population of high liver cancer regions in Thailand: Volatile nitrosamine (VNA) levels in Thai food. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.297-305, 1999.

MÜLLER, W.D. Curing nas smoking: are they healthier processes today than used to be? **Fleischwirtschaft**, v.71, n.1, p.61-65, 1991.

MURPHY, K.M. O'GRADY, M.N.; KERRY, J.P. Effect of varying the gas headspace to meat ratio on the quality and shelf-life of beef steaks packaged in high oxygen modified atmosphere packs. **Meat Science**, v. 94, p.447–454, 2013.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NASSU, R.T.; UTTARO, B.; AALHUS, J.L.; ZAWADSK, S.; JUÁREZ, M.; DUGAN, M. E.R. Type of packaging affects the colour stability of vitamin E enriched beef. **Food Chemistry**, v.135, p. 1868–1872, 2012.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**, 2.ed. Marcel Dekker, p.139-244, 1985.

NEPA (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação) – Unicamp (Universidade Estadual de Campinas). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, v.1, p.42, 2004.

NOPPE, H.; MARTINEZ, S. A; VERHEYDEN, K.; VAN LOCO, J.; COMPANYO BELTRAN, R.; BRABANDER, H.F. de. Determination of bixin and norbixin in meat using liquid Chromatography and photodiodearray detection **Food Additives and Contaminants**, v.26, p.17-24, 2009.

OHSHIMA, H., BARTSCH, H. Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. **Cancer Research**, v.41, p.3658–3662, 1981.

OLIVEIRA, J. S. **Purificação de Compostos de Urucum por Processo Absortivo**. 192f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

OLIVEIRA, T.L.C. DE.; SOARES, R.A.; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemon grass essential oils against *Salmonella Enteritidis* in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v.93 p.645–651, 2013.



OLIVO, R. Fatores que influenciam as características das matérias-primas cárneas e suas implicações tecnológicas. **Revista Nacional da Carne**, v.307, p.72-83, 2002.

OLIVO, R.; OLIVO, N. **O mundo das carnes: ciência, tecnologia e mercado**. 3. ed. Criciúma: Ed. do autor, 2006.

OLSEN, S. J.; BISHOP, R.; BRENNER, F. W.; ROELS, T. H.; BEAN, N.;TAUXE, R. V. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States. **Journal of Infectious Disease**, v.183, p.753–761, 2001.

PARDI, C. M. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: UFG, v.1, 2001.

PEGG, R. B.; SHAHIDI, F. Unraveling the Chemical Identity of Meat Pigments. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 6, p. 561-589, 1997.

PIERSON, M. D. Nitrite, nitrite alternatives and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 17, p. 141-187, 1982.

PIGARRO, M. A. P.; SANTOS, M. **Avaliação microbiológica da carne moída de duas redes de supermercados da cidade de Londrina- PR**. 2008. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Universidade Castelo Branco, Instituto Qualittas, Londrina, 2008.

PIMENTEL, F. A.; STRINGHETA, P. C. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratoras. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 3, n. 1, p. 53-57, 1999.

PRENTICE-HERNANDEZ, C.; RUSIG, O.; CARVALHO, P.R. N. Influência do tempo e aquecimento na degradação térmica de bixina em extratos alcalinos de urucum (*Bixa orellana* L.). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 4, p. 819-828, 1993.

PRESTON, H. D.; RICKARD, M. D. Extraction and chemistry of annatto. **Food Chemistry**, v. 5, p. 47-56, 1980.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **The Science of Meat and Meat Products**. 2. ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1971.

PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciência de la carne y de los productos cárnicos**. Zaragoza: Acribia, 1976.

PUGA, D. M. U.; CONTRERAS, C. J. C.; TURNBULL, M. R. An evaluation of tenderization of forequarter bovine meat (*triceps brachii*) through methods of ageing and injection with acetic and lactic acids. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, p. 88-96, 1999.

QUEIROZ, Y. U.; DAUD, K. O. ; SOARES, R. A. M.; SAMPAIO, G. R.; CAPRILES, V. D.; TORRES, E. A. F. S. Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas de hambúrgueres com reduzidos teores de gordura e de colesterol. **Revista Nacional da Carne**, v. 338, p. 84-89, 2005.

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

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMÍREZ, M. R.; MORCUENDE, D.; ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. . Effects of the type of frying with culinary fat and refrigerated storage on lipid oxidation and colour of fried pork loin chops. **Food chemistry**, v. 88, n. 1, p. 85-94, 2004.

RICKERT, J. A.; BRESSLER, L.; BALL, C. O.; STIER, E. F. Factors affecting quality of prepackaged meat: II. Color studies. C. Effects of air and oxygen under different pressures upon color product. **Food Technology**, v. 11, p. 625-632, 1957.

RIISPOA REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL, 1952. Versão para internet. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arg\\_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arg_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf)> Acesso em: 22/04/2014.

RIOS, A. O.; MERCADANTE, A. Z. Otimização das condições para obtenção de padrão de bixina e das etapas de extração e saponificação para quantificação de bixina em “snacks” extrusados por CLAE. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 203-213, 2004.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e biotecnologia**, São Paulo: Premier, 1997.

ROCHA GARCIA, C. E.; YOUSSEF, E. Y.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; FIGUEIREDO, E. ; SHIMOKOMAKI, M. Preservation of spent leghorn hen meat by a drying and salting process. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 12, p. 335-340, 2003.

ROÇA, R.O., BONASSI, I.A. **Temas de tecnologia: carne e produtos derivados**. UNESP, Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, p.129-139, 1981.

ROÇA, R.O. **Tecnologia da carne e produtos derivados**. Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu 2000. Disponível em <[http://www.eng.ufsc.br/disci/eqa5217/material\\_didatico/propriedades\\_da\\_carne.pdf](http://www.eng.ufsc.br/disci/eqa5217/material_didatico/propriedades_da_carne.pdf)> Acesso em 09/05/2014.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**, OMNI Research, ILSI Human Nutritional Institute, Washington, 64 p. 2001.

ROUSSEFF R. L, High Performance Liquid Chromatographic Separation and Spectral Characterization of the Pigments in Tumeric and Annatto. **Journal of Food Science**, v.3, p.1823-1826, 1988.

SANT'ANNA, V.; GURAK, P. D.; FERREIRA MARCZAK, L. D.; TESSARO, I. C. Tracking bioactive compounds with colour changes in foods—A review. **Dyes and Pigments**, v. 98, p. 601-608, 2013.

SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA RAO, P. G.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Science Technology**, v.40, p.131-141, 2003.

SCANLAN, R. A. N-nitrosamines in food. CRC Critical Review. **Food Technology**, v.5, p.357, 1973.

SCHWEINSBERG, F.; BURKLE, V. Nitrite: a co-carcinogen? **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 109, p. 200-202, 1985.

SCIENTIA. Disponível em: <<http://www.scientia.blog.br/wordpress/29-04-2013/734>> Acesso em: 05/05/2014.

SCOTTER, M. J.; WILSON, L. A.; APPLETON, G. P.; CASTLE, L. Analysis of annatto (*Bixa orellana*) food coloring formulations: 1. determination of coloring components and colored thermal degradation products by high-performance liquid

chromatography with photodiode array detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 1031-1038, 1998.

SCOTTER, M. J.; THORPE, S. A.; REYNOLDS, S. L.; WILSON, L. A.; STRUTT, P. R. Characterization of the principal colouring components of annatto using high performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Food Additives and Contaminants**, v.11, p.301-315, 1994.

SCOTTER, M.J.; WILSON, L. A.; APLETON G. P.; CASTLE L.; Analysis of annatto (*Bixa orellana* L.) Food Colouring Formulations. 2 Determination of Aromatic Hydrocarbon Thermal Degradation Products by Gas Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p.484-488, 2000.

SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; APPLETON, G. P. Kinetics and yields for the formation of coloured and aromatic thermal degradation products of annatto in foods. **Food Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 365-375, 2001.

SERAFINI, L.F. **Atividade antioxidante dos extratos de manjerona e Pólen apícola: efeitos na qualidade de hambúrguer**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA V.C.A.; SILVEIRA, N.F. **Manual e métodos de análise microbiológica de alimentos**, 3<sup>a</sup>ed. Sao Paulo: Varela; 2007.

SILVA, P. I. **Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em semente de urucum (*Bixa orellana* L.)** 141f. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, para obtenção de título de mestre em Tecnologia de Alimentos, Viçosa, 2007.

SILVA, P. I.; NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C.. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (*Bixa orellana* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1892-1897, 2009.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. dos S.; KOBLITZ, M. G. B. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina Ciências Agrárias**, v. 31, p. 669-682, 2010.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.32, p.67-103, 1992.

SHIMOKOMAKI, M.; FRANCO, B. D. M.; CARVALHO, B. C. Charque e produtos afins: tecnologia e conservação - uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 21, p. 25-35, 1987.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p. 675-690, 1996.

SHIMOKOMAKI, M. Charque e Jerked beef e Carne de Sol. In: SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**, ed. Varela, p. 47- 62. 2006.

SIMIC, M.G.; JAVANOVIC, S.V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. (Ed.). *Food phytochemicals for cancer prevention*. Washington: **American Chemical Society**, v.547. p.20-33, 1994.

SKIBISTED, L. H. Cured meat products and their oxidative stability. In: LEDWARD, D. A.; JONHST, D. E.; KNIGHT, M. K. The chemistry of muscle. **Based foods. Cambridge**, p. 267-289, 1992.

SKOG, K. I.; JOHANSSON, M. A. E.; JAÈ GERSTA, M. I. Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.879-896, 1998.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 1ª ed. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

SPECK, R. S. **Compendium of methods for themicrobiological examination of foods**. Washington, D.C.:American Public Health Association, 914p, 1984.

SPENCER, E. H.; FRANK, E.; MCINTOSH, N. F. Potential effects of the next 100 billion hamburgers sold by McDonald's. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 28, n. 4, p. 379-381, 2005.

STELZLENI, A. M.; PONRAJAN, A.; HARRISON, M. A. Effects of buffered vinegar and sodium dodecyl sulfate plus levulinic acid on *Salmonella Typhimurium* survival, shelf-life, and sensory characteristics of ground beef patties. **Meat Science**, v. 95, p.1-7, 2013.

STRINGHETA, P.C. **Corantes naturais uma opção inteligente**. In: congresso brasileiro de corantes naturais, 2000. João Pessoa. Resumo. João Pessoa: SBCN, p.27, 2000.

STROHECKER, M. G.; FAUSTAM, C.; FURR, H.; HOAGLAND, T.A.; WILLIAMS. Vitamin e supplementation effects on color and lipid stability of whole and ground lamb. **Journal of Muscle Foods**, Trumbull, v.8, n.4, p.413-426, 1997.

TARLADGIS, B. G.; PEARSON, A. M.; JUN DUGAN, L. R. Chemistry of the 2-thiobarbituric test for determination of oxidative rancidity in foods II. Formation of the TBA- malonaldehyde complex without acid-heat treatment. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.5, p. 602-604, 1964.

TERRA, N. N.; CICHOSKI, A. J.; FREITAS, R. J. S. de. Values of nitrite and TBARS along the process and storage of cured, ripened and fermented pig shoulders. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 965-970, 2006.

TERRY, P.; TERRY, J.B.; WOLK, A. Fruit and vegetable consumption in the prevention of cancer: an update. **Journal of International Medicine**, v.250, p.280-290, 2001.

TORRES, E.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I.; BOOREN, A. M.; SHIMOKOMAKI, M. Effect of salt on oxidative changes in pre and post rigor ground beef. **Meat Science**, v. 23, n. 3, p. 151-163, 1988.

TRINDADE, M. A.; NUNES, T. P.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; FELICIO, P. E. Estabilidade oxidativa e microbiológica em carne de galinha mecanicamente separada e adicionada de antioxidantes durante período de armazenamento a -18°C. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 28, n. 1, p.160-168, 2008.

UENOJO, M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenoides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

WALSH, M. M.; KERRY, J. F.; BUCLEY, D.J.; ARENDT, E. K.; MORRISSEY, P. A. Effect of dietary supplementation com alfa-tocopheryl acetate on the stability reformed and restructured low nitrite cured turkey products. **Meat Science**, v. 50, n. 2, p. 91-201, 1998.

WALTERS, C.L. Reactions of nitrate and nitrite in foods with special reference to the determination of N-nitroso compounds. **Food Additives and Contaminants**, v.9, n.5, p.441-447, 1992.

WHITE, C. A.; HALL, L. P. The effect of temperature abuse on *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus* in raw beef and chicken substrates during frozen storage. **Food Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 97-104, 1984.

WHO. Food Additives Series No 5. Nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds. **Forty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Committee on Food Additives**, Geneva, 1978.

WOODS, L. F. J.; WOOD, J. M.; GIBBS, P. A. Nitrite. In: GOULD, G. W. (Ed.) **Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures**, p. 225-246, 1990.

World Cancer Research Fund and the American Institute for Cancer research; Food, Nutrition and the prevention of cancer: A global perspective. **American Institute for cancer Research**, Washington, 1997.

WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v.28, n.11, p.743-745, 1990.

YOUSSEF, Y. E.; GARCIA, C. E. R.; SHIMOKOMAKI, M. Effect of salt on color and warmed over flavor in charqui meat processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46. n. 4, p. 595-600, 2003.

YOUSSEF, E. Y.; ROCHA GARCIA, C. E.; FIGUEIREDO, B.; SHIMOKOMAKI, M. Níveis residuais de sais de cura e seu efeito antioxidante em Jerked Beef. **Semina Ciências Agrárias**, v. 32, p. 645-650, 2011.

XAVIER, V. G.; JOELE, M. R. S. P. Avaliação das condições Sanitárias da Carne Bovina In Natura Comercializada na Cidade de Belém, PA. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n.125, p. 64-74, out. 2004.

ZARRINGHALAMI, S., SAHARI, M.A., HAMIDI-ESFEHANI, Z. Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. **Meat Science**, v.81, p.281-284, 2009.

**ANEXOS**

ANEXO 1 - COMITÊ DE ÉTICA APROVADO .....	88
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTE DA PESQUISA .....	91
ANEXO 3 - FICHA ANÁLISE SENSORIAL .....	93
ANEXO 4 - GRAU DE PUREZA DOS SAIS DE BIXINA .....	94
ANEXO 5 - L* COMPARAÇÃO DOIS A DOIS CRU E GRELHADO TEMPO ZERO, 30 E 60 DIAS COM SUBSTITUINTES DO NITRITO POR SAL DE BIXINA .....	95
ANEXO 6 - a* COMPARAÇÃO DOIS A DOIS CRU E GRELHADO TEMPO ZERO, 30 E 60 DIAS COM SUBSTITUINTES DO NITRITO POR SAL DE BIXINA .....	96
ANEXO 7 - b* COMPARAÇÃO DOIS A DOIS CRU E GRELHADO TEMPO ZERO, 30 E 60 DIAS.....	97
ANEXO 8 – COMPOSIÇÃO MEIOS DE CULTURA MICROBIOLOGIA .....	98



## ANEXO 1 - COMITÊ DE ÉTICA APROVADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** "Uso de sais de bixina extraídos do urucum (Bixa orellana L.) como substituintes do nitrito de sódio em produtos cárneos reestruturados"

**Pesquisador:** SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 22206713.9.0000.0102

**Instituição Proponente:**

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 534.222

**Data da Relatoria:** 12/02/2014

**Apresentação do Projeto:**

"Uso de sais de bixina extraídos do urucum (Bixa orellana L.) como substituintes do nitrito de sódio em produtos cárneos reestruturados"

**Autores:** SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO ( Mestranda) e Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia, (Orientador)

**Objetivo da Pesquisa:**

**Geral:** investigar o uso de carotenoides extraídos do urucum como substituintes do nitrito de sódio em produtos cárneos.

**Específicos:** Obter extratos dos sais de bixina com elevado grau de pureza e toxicidade compatível com o uso alimentício; Desenvolver um corante natural por meio da combinação de diferentes concentrações de carotenoides extraídos do urucum capaz de proporcionar a coloração vermelha característica de produtos cárneos processados, em substituição ao efeito corante do nitrito de sódio; Elaborar uma formulação por meio da combinação dos sais de bixina objetivando simular a coloração vermelha característica dos produtos cárneos; Caracterizar o efeito antioxidante da combinação de carotenoides extraídos do urucum visando minimizar o uso de nitrito de sódio como antioxidante nos produtos cárneos reestruturados; Mensurar o efeito antioxidante da combinação

**Endereço:** Rua Padre Camargo, 280

**Bairro:** 2º andar

**CEP:** 80.060-240

**UF:** PR

**Município:** CURITIBA

**Telefone:** (41)3360-7259

**E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 534.222

de carotenoides extraídos do urucum aplicada a produtos cárneos; Identificar um possível efeito antimicrobiano dos carotenoides extraídos do urucum em produtos cárneos; Avaliar o efeito dos sais de bixina, sobre a aceitação sensorial do produtos cárneos reestruturados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os autores, a ocorrência de danos aos envolvidos na pesquisa é improvável, pois, não será alterada nenhuma forma utilizada por estes, além, de examinar com base na análise sensorial se existe alguma alteração no limite de percepção de cores pelo julgador.

Segundo os autores, apesar da improbabilidade de existência de riscos, como medidas de proteção ou minimização de qualquer risco eventual, os julgadores serão orientados como foi delineado os estudos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Protocolo foi revisado .

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos exigidos foram apresentados pelos pesquisadores.

**Recomendações:**

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendências atendidas.

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS)

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Rua Padre Camargo, 280  
 Bairro: 2º andar CEP: 80.060-240  
 UF: PR Município: CURITIBA  
 Telefone: (41)3360-7259 E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
PARANÁ - SETOR DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 534.222

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondendo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS)

CURITIBA, 19 de Fevereiro de 2014

---

**Assinador por:**  
**Claudia Seely Rocco**  
**(Coordenador)**

## ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTE DA PESQUISA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPANTE DA PESQUISA

a) Eu, **Carlos Eduardo Rocha Garcia** (orientador da pesquisa), pesquisador da Universidade Federal do Paraná, e **Samanta Daliana Golin Pacheco** mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, estamos convidando você, do departamento de farmácia da UFPR, a se integrar em um estudo intitulado "Uso de sais de bixina extraídos do urucum (Bixa orellana L.) como substituintes do nitrito de sódio em produtos cárneos reestruturados".

b) Este projeto tem como objetivo investigar o uso de carotenoides extraídos do urucum como substituintes do nitrito de sódio em produtos cárneos, como corante e conservante.

c) Obter extratos dos sais de bixina com elevado grau de pureza e toxicidade compatível com o uso alimentício;

d) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: a inovação de um novo aditivo para produtos cárneos como conservante, e, além do sal de bixina ser utilizado como corante, utilizar também suas propriedades como antioxidante.

e) A pesquisadora e orientador, Carlos Eduardo Rocha Garcia (email: carlos.garcia@ufpr.br) - responsáveis por este estudo poderão ser contatados na Av Pref. Lothário Meissner, 632, Jarim Botânico (UFPR) CEP 80.210-170, em horário comercial no fone 3360-4093 ou no email (samantagolin@ufpr.br), para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

f) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um participante de pesquisa, você pode contatar Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, rua Padre Camargo, 280, 2ª andar, CURITIBA\_ PR CEP 80.060-240, E-mail: [cometica.saude@ufpr.br](mailto:cometica.saude@ufpr.br), (41)3360-7259. Trata-se de um grupo de indivíduos com conhecimento científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada do estudo de pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

g) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

h) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas (a pesquisadora e seu orientador). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a

confidencialidade.  
 Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa  
 em Seres Humanos do Setor de Ciências da  
 Saúde/UFPR.  
 Parecer CEP/SD-PB.nº 534 222  
 na data de 19/02/2014.

Rubricas:  
 Participante da Pesquisa e /ou responsável legal\_-  
 \_\_\_\_\_  
 Pesquisador Responsável ou quem aplicou o

i) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro,.

j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios da pesquisa. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu trabalho.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do participante da pesquisa)  
Local e data

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE  
Local e data

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Setor de Ciências da  
Saúde/UFPR.  
Parecer CEP/SD-PB.nº 534 222  
na data de 19 / 02 / 2014.

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da FUFPR  
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240  
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

## ANEXO 3 - FICHA ANÁLISE SENSORIAL

Ficha 1 – Modelo para teste de ordenação

Amostra: Julgador: Data:

Você está recebendo quatro amostras codificadas. Indique os códigos das amostras, colocando-as em ordem crescente quanto a sua preferência de cor.

(menos agradável) \_\_\_\_\_ (mais agradável)

Comentários:

## ANEXO 4 - GRAU DE PUREZA DOS SAIS DE BIXINA

## PuP Statistics Report

No	Filename	tR (min)	Spectrum Type	Correction	PuP (300.00->600.00 nm)
1	bixina001.run	9.720	Within	Baseline	459.575
2	bixina001.run	9.285	Within	Baseline	459.246
3	bixina001.run	10.423	Within	Baseline	459.653
Best Correlation: 1 and 3					Sim: 0.998934
Worst Correlation: 2 and 3					Sim: 0.998432
Average PuP = 459.491 nm					Standard Deviation = 0.176 nm

## PuP Statistics Report

No	Filename	tR (min)	Spectrum Type	Correction	PuP (300.00->600.00 nm)
1	norbixina.run	6.683	Within	Start	457.340
2	norbixina.run	6.353	Within	Start	456.745
3	norbixina.run	7.230	Within	Start	456.804
Best Correlation: 2 and 3					Sim: 0.999803
Worst Correlation: 1 and 3					Sim: 0.999453
Average PuP = 456.963 nm					Standard Deviation = 0.267 nm

## PuP Statistics Report

No	Filename	tR (min)	Spectrum Type	Correction	PuP (300.00->600.00 nm)
1	sal de bixina.run	6.320	Within	Baseline	461.052
2	sal de bixina.run	6.105	Within	Baseline	461.085
3	sal de bixina.run	6.683	Within	Baseline	461.232
Best Correlation: 2 and 3					Sim: 0.999863
Worst Correlation: 1 and 2					Sim: 0.999774
Average PuP = 461.123 nm					Standard Deviation = 0.078 nm

ANEXO 5 - L\* COMPARAÇÃO DOIS A DOIS CRU E GRELHADO TEMPO ZERO, 30 E 60 DIAS COM SUBSTITUINTES DO NITRITO POR SAL DE BIXINA

amostra	Média	D. Padrão	Gauss.	homocedasticidade	médias	medianas
L ctrl c t0	40,110	0,549	aceita	Não aceita	Não difere	Não difere
L ctrl g t0	44,82	5,79	aceita	Não aceita	p= 0,056	p = 0,4948
L bix c t0	36,025	2,713	Aceita	Aceita	Não difere	Não difere
L bix g t0	37,586	1,436	aceita	Aceita	p= 0,181	p= 0,2271
L bixnit c t0	38,65	2,91	aceita	Aceita	Não difere	Não difere
L bixnit g t0	40,306	2,813	aceita	aceita	p= 0,269	p= 0,4309
L nit c t0	41,868	1,816	aceita	Não aceita	Não difere	Não difere
L nit g t0	44,28	2,90	aceita	Não aceita	p=0,072	p=0,1563
L ctrl c t30	34,341	0,961	aceita	aceita	difere	difere
L ctrl g t30	39,102	2,143	aceita	aceita	p=0,000	p=0,0009
L bix c t30	31,166	1,748	aceita	aceita	difere	difere
L bix g t30	34,784	1,021	aceita	aceita	p=0,000	p=0,0019
L bixnit c t30	30,770	1,031	aceita	aceita	difere	difere
L bixnit g t30	38,195	1,826	aceita	aceita	p=0,000	p=0,0009
L nit c t30	35,946	1,619	aceita	Não aceita	difere	difere
L nit g t30	38,797	0,417	aceita	Não aceita	p=0,002	p=0,0009
L ctrl c t60	35,185	1,889	aceita	aceita	difere	difere
L ctrl g t60	39,196	2,067	aceita	aceita	p=0,001	p=0,0074
L bix c t60	31,763	0,951	Não aceita	Não aceita	difere	difere
L bix g t60	35,985	2,092	aceita	Não aceita	p=0,000	p=0,0019
L bixnit c t60	31,087	1,532	aceita	aceita	difere	difere
L bixnit g t60	38,674	1,840	aceita	aceita	p=0,000	p=0,0009
L nit c t60	36,313	1,932	aceita	aceita	difere	difere
L nit g t60	39,229	1,150	Não aceita	aceita	p=0,004	p=0,0014

FONTE: A autora (2014) MP matéria prima, CTRL tratamento controle , BIX tratamento sal de bixina (500ppm), BIXNIT tratamento NaNO<sub>2</sub> (75 ppm/) e sal de bixina (250ppm), NIT tratamento NaNO<sub>2</sub> (150ppm).



ANEXO 6 - a\* COMPARAÇÃO DOIS A DOIS CRU E GRELHADO TEMPO ZERO, 30 E 60 DIAS COM SUBSTITUINTES DO NITRITO POR SAL DE BIXINA

amostra	Média	D. Padrão	Gauss.	homocedasticidade	médias	medianas
a*ctrl c t0	7,7075	0,1583	Aceita	Não aceita	difere	difere
a*ctrl g t0	5,306	0,823	Aceita	Não aceita	p=0,000	p=0,0009
a* bix c t0	15,778	1,682	Aceita	Não aceita	Não difere	Não difere
a* bix g t0	15,561	2,333	Aceita	Não aceita	p=0,835	p=0,9581
a* bixnit c t0	12,999	1,637	Aceita	Não aceita	difere	difere
a* bixnit g t0	17,061	2,026	Aceita	Não aceita	p=0,001	p=0,0033
a*nit c t0	5,922	0,418	Aceita	Não aceita	difere	difere
a*nit g t0	10,381	0,763	Aceita	Não aceita	p=0,000	p=0,0009
a*ctrl c t30	8,177	0,590	Aceita	Aceita	difere	difere
a*ctrl g t30	5,942	0,705	Aceita	Aceita	p=0,000	p=0,0009
a* bix c t30	17,143	1,643	Aceita	Aceita	difere	difere
a* bix g t30	14,388	1,657	Aceita	Aceita	p=0,005	p=0,0181
a* bixnit c t30	15,565	0,855	Aceita	Aceita	Não difere	Não difere
a* bixnit g t30	15,683	2,144	Aceita	Aceita	p=0,889	p=0,5635
a*nit c t30	6,949	0,525	Aceita	aceita	Difere	Difere
a*nit g t30	13,124	1,235	Não aceita	Aceita	p=0,000	p=0,0009
a*ctrl c t60	8,240	0,482	Aceita	Aceita	Difere	Difere
a*ctrl g t60	6,6095	0,615	Aceita	Aceita	p=0,000	p=0,0009
a* bix c t60	16,663	1,144	Aceita	Aceita	Difere	Não difere
a* bix g t60	15,138	1,455	Aceita	Aceita	p=0,037	p=0,0661
a* bixnit c t60	15,508	1,155	Aceita	Aceita	Não difere	Não difere
a* bixnit g t60	15,761	2,193	Aceita	Aceita	p=0,778	p=0,4948
a*nit c t60	7,215	1,079	Não aceita	Aceita	Difere	Difere
a*nit g t60	12,593	1,026	Aceita	Aceita	p=0,000	p=0,0009

FONTE: A autora (2014) MP matéria prima, CTRL tratamento controle , BIX tratamento sal de bixina (500ppm), BIXNIT tratamento NaNO<sub>2</sub> (75 ppm/) e sal de bixina (250ppm), NIT tratamento NaNO<sub>2</sub> (150ppm).

ANEXO 7 - b\* COMPARAÇÃO DOIS A DOIS CRU E GRELHADO TEMPO ZERO, 30 E 60 DIAS

amostra	Média	D. Padrão	Gauss.	homocedasticidade	médias	medianas
b*ctrl c t0	7,894	0,307	Aceita	Não aceita	difere	difere
b*ctrl g t0	11,761	0,773	Aceita	Não aceita	p=0,000	p=0,0009
b* bix c t0	11,710	2,014	Aceita	Aceita	difere	difere
b* bix g t0	22,821	2,341	Não	Aceita	p=0,000	p=0,0009
b* bixnit c	13,356	2,641	Aceita	Aceita	difere	difere
b* bixnit g	21,463	1,980	Aceita	Aceita	p=0,000	p=0,0009
b*nit c t0	8,765	0,621	Aceita	Aceita	difere	difere
b*nit g t0	11,254	0,499	Aceita	Aceita	p=0,000	p=0,000
b*ctrl c t30	11,094	0,503	Aceita	Aceita	difere	difere
b*ctrl g t30	11,170	0,941	Não	Aceita	p=0,017	p=0,0239
b* bix c	14,290	1,656	Aceita	Aceita	difere	difere
b* bix g	17,174	2,139	Aceita	Aceita	p=0,010	p=0,0074
b* bixnit c	18,375	1,204	Não	Aceita	Não difere	Não difere
b* bixnit g	17,479	0,973	Aceita	Aceita	p=0,125	p=0,0831
b*nit c t30	10,709	1,023	Aceita	Não aceita	Não difere	Não difere
b*nit g t30	11,261	0,399	Aceita	Não aceita	p=0,188	p=0,1893
b*ctrl c t60	10,385	0,549	Aceita	Não aceita	difere	difere
b*ctrl g t60	11,501	0,978	Não	Não aceita	p=0,017	p=0,0136
b* bix c	13,409	0,635	Aceita	Não aceita	difere	difere
b* bix g	18,370	2,621	Aceita	Não aceita	p=0,001	p=0,0009
b* bixnit c	17,964	1,591	Aceita	Aceita	Não difere	Não difere
b* bixnit g	17,442	1,152	Aceita	Aceita	p=0,467	p=0,3184
b*nit c t60	10,191	0,577	Aceita	Aceita	difere	difere
b*nit g t60	11,400	0,555	Aceita	Aceita	p=0,001	p=0,0054

FONTE: A autora (2014) MP matéria prima, CTRL tratamento controle , BIX tratamento sal de bixina (500ppm), BIXNIT tratamento NaNO<sub>2</sub> (75 ppm/) e sal de bixina (250ppm), NIT tratamento NaNO<sub>2</sub> (150ppm).

## ANEXO 8 – COMPOSIÇÃO MEIOS DE CULTURA MICROBIOLOGIA

**ÁGAR BAIRD-PARKER**

**Aplicação:** Meio seletivo /diferencial para isolamento e contagem de *S. aureus*

**Composição da base**

Triptona (peptona de caseína digestão pancreática)	10g
Extrato de carne	5g
Extrato de levedura	1g
Piruvato de sódio	10g
Glicina	12g
Cloreto de Lítio	5g
Ágar	20g
Água destilada	940mL
pH 7,0±0,2 – 121°C/15min	

## Suplementos

Solução aquosa de telurito de potássio1%	10 mL/940mL base
Emulsão gema de ovo:salina (1:1 peso/peso)	50mL/940mL base

**Preparação:** preparar a base, esterilizar – 121°C/15min, resfriar a 45-50°C e adicionar assepticamente os suplementos estéreis previamente preparados. Plaquear imediatamente, o meio completo não pode ser aquecido. Estocar as placas sob refrigeração por não mais de 48h. **Solução aquosa de telurito de potássio1%.** Dissolver 1g de telurito de potássio em 100mL de água destilada, esterilizar por filtração e estocar em frasco escuro, sob refrigeração. **Emulsão de gema de ovo.** Mergulhar os ovos em etanol 70% por 10 minutos, flambar, abrir assepticamente e transferir as gemas para um frasco estéril tarado. Adicionar às gemas uma quantidade de solução salina 0,85% estéril, suficiente para diluição 1:1(peso/peso). Misturar por agitação ou com auxílio de baguetas estéreis, até obter uma suspensão homogênea.

**HE****ÁGAR ENTÉRICO DE HECKTOEN**

**Aplicação:** Meio seletivo para detecção presuntiva de *Salmonella*

**Composição**

Proteose peptonada	12g
Extrato de levedura	3g
Sais Biliares nº3	9g
Lactose	12g
Sacarose	12g
Salicilina	2g
Cloreto de sódio	5g
Tiosulfato de Sódio	5g
Citrato férrico amoniacal	1,5g
Azul de bromotimol (32,5mL da solução 0,2%)	0,065g
Fucsina ácida	0,1g
Ágar	14g
Água destilada	1litro
pH 7,5±0,2	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes e aquecer em banho, sob constante agitação, até a completa dissolução do ágar. Não autoclavar. Plaquear imediatamente, não deve ser reaquecido. **Solução 0,2% d azul de bromotimol:** Dissolver 0,1g em 2,5mL de NaOH 0,1N e completar o volume para 50 mL com água destilada.

**BHIA/BHI****ÁGAR (CALDO) INFUSÃO CÉREBRO CORAÇÃO/BRAIN HEART INFUSION**

**Aplicação:** Meio de enriquecimento e manutenção para uso geral.

**Composição**

Infusão de 200g de cérebro de bezerro (sólidos)	7,7g
Infusão de 250g de coração de boi (sólidos)	9,8g
Proteose peptona	10g
Dextrose	2g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato dissódico (NaHPO <sub>4</sub> )	2,5g
Água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar a 121°C/15min. Para a preparação do ágar, adicionar 15g de ágar ágar cada litro de caldo.

**LIA****AGAR LISINA FERRO/ LYSINE IRON AGAR**

**Aplicação:** Meio para provas bioquímicas, teste de descarboxilação da lisina e teste de produção de H<sub>2</sub>S

**Composição**

Peptona	5g
Extrato de levedura	3g
Dextrose	1g
Cloridrato de L-Lisina	10g
Citrato férrico amoniacal	0,5g

Tiosulfato de sódio	0,04g
Púrpura de bromocresol (2mL de solução 1%)	0,02g
Ágar	15g
Água destilada	1 litro
pH 6,7±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, fundir o ágar, distribuir em tubos de 10X100mm (5ml/tubo), esterilizar a 121°C/15min e inclinar, mantendo fundo de 2,5cm, no mínimo, porque a reação de descarboxilação da lisina é mais eficiente em condições anaeróbias. **Solução 1% de púrpura de bromocresol:** Dissolver 1g em 1,9mL de NaOH 0,1N e completar o volume para 10 mL com água destilada.

## TSI

### ÁGAR TRÍPLICE AÇÚCAR FERRO/TRIPLE SUGAR IRON AGAR

**Aplicação:** Meio para prova bioquímica, teste de fermentação da glicose, lactose e sacarose, teste de produção de H<sub>2</sub>S.

#### Composição

Extrato de carne	3g
Extrato de levedura	3g
Peptona	15g
Proteose peptona	5g
Glicose	1g
Lactose	10g
Sacarose	10g
Sulfato Ferroso (FeSO <sub>4</sub> )	0,2g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Tiosulfato de sódio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,3g
Vermelho de fenol (12 mL da solução 0,2%)	0,024g

Ágar	12g
água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, fundir o ágar, distribuir em tubos de 10X10mm(4-5mL/tubo), esterilizar a 121°C/15min e inclinar, mantendo fundo de no mínimo 2,5cm. **Solução 0,2% de vermelho de fenol:** Dissolver 0,1g em 4 mL de NaOH 0,1N e completar o volume para 50mL com água destilada.

## XLD

### ÁGAR XILOSE LISINA DESOXICOLATO

**Aplicação:** Meio seletivo diferencial para isolamento presuntivo de *Salmonella*

#### Composição

Extrato de levedura	3g
L-Lisina	5g
Xilose	3,75g
Lactose	7,5g
Sacarose	7,5g
Desoxicolato de sódio	2,5g
Citrato férrico amoniacal	0,8g
Tioossulfato de sódio	6,8g
Cloreto de sódio	5g
Vermelho de fenol (40mL da solução 0,2%)	0,08g
Ágar	15g
água destilada	1 litro
pH 7,4±0,2 – fervura	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e ferver em banho-maria, sob constante agitação até completa fusão do ágar. Não autoclavar. Plaquear imediatamente, não pode ser reaquecido. Solução 0,2% de vermelho fenol: dissolver 4mL de NaOH 0,1N e completar o volume para 50 mL com água destilada.

## H<sub>2</sub>Op

### ÁGUA PEPTONADA 0,1%

**Aplicação:** diluente para homogeneização e diluição de amostras para análise.

#### Composição

Peptona	1g
água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Dissolver a peptona na água destilada e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade requerida. Esterilizar a 121°C/15min.

## H<sub>2</sub>Osp

### ÁGUA SALINA PEPTONADA

**Aplicação:** Diluente para homogeneização e diluição de amostras para análise.

#### Composição

NaCl	8,5g
Peptona	1g
água destilada	1 litro
pH 7,0±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e distribuir em tubos ou frascos, na quantidade requerida. Esterilizar a 121°C/15min.



**EC****CALDO E. COLI**

**Aplicação:** Meio para contagem de coliformes fecais, confirmação de resultado presuntivo pelo método NMP.

**Composição**

Triptose	20g
Lactose	5g
Sais biliares n°3	1,5g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4g
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5g
Cloreto de sódio	5g
Água destilada	1 litro
pH 6,9±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e distribuir em tubos de 15X150mm com tubo de Durhan (aproximadamente 6mL/tubo) e esterilizar a 121°C/15min.

**CL****CALDO LACTOSADO**

**Aplicação:** Meio de pré-enriquecimento para detecção de *Salmonella*

**Composição**

Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Lactose	5g

Água destilada	1 litro
pH 6,9±0,2 – 121°C/15min	

## LST

### CALDO LAURIL SULFATO TRIPTOSE/LAURYL SULFATE BROTH

**Aplicação:** Meio seletivo para detecção presuntiva de coliformes totais, coliformes fecais e *E. coli* pelo método do NMP.

#### Composição

Triptose	20g
Lactose	5g
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2,75g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,75g
NaCl	5g
Lauril sulfato de sódio	0,1g
Água destilada	1 litro
pH 6,8±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, distribuir em tubos 16X150mm com tubo de Durhan (aproximadamente 10mL/tubo) e esterilizar a 121°C/15min.

## RV (R10)/RVS

### CALDO RAPPAPORT-VASSILIADIS MODIFICADO

### CALDO RAPPAPORT – VASSILIADIS SOJA

**Aplicação:** meio seletivo para enriquecimento de *Salmonella* em alimentos.

Composição do meio formulado em laboratório. Há duas formulações de Caldo Rappaport-Vassiliadis recomendadas para a análise de *Salmonella*. O Caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado (RV), também chamado de R10 e o Caldo Rappaport-Vassiliadis Soja(RVS).A principal diferença entre eles é a fonte da peptona usada. O método do BAM/FDA recomenda o RV. A ISO 6579 recomenda o RVS. O método do MLG/FSIS recomenda ambos. Para a formulação no laboratório, preparar separadamente as seguintes soluções:

#### Solução A para formulação do RV (R10)

Triptona	5g
NaCl	8g
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,6g
água destilada	1 litro

#### Solução A para formulação do RVS

Peptona de soja	5g
NaCl	8g
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,4g
Fosfato dipotássico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,2g
Água destilada	1 litro

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, aquecendo se necessário. Essa solução deve ser preparada no dia em que for preparado o meio completo.

#### Solução B

MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	400g
Água destilada	1 litro

**Preparação:** Mantendo a proporção. Dissolver todo conteúdo de um novo frasco de cloreto de magnésio na água, porque o sal é muito higroscópico. Por exemplo, adicionar 250g do sal à 625 mL de água, o que vai resultar em um volume total de

788mL de solução. Acondicionar em frasco escuro, com a tampa bem apertada. Segundo a ISO 6579 (2002), a solução pode ser estocada à temperatura ambiente por até dois anos. O BAM/FDA (2001) recomenda um ano.

### Solução C

Verde de malaquita oxalato (Merck)	400g
Água destilada	100 L

Preparação. Dissolver o corante na água e estocar em frasco escuro. Segundo a ISO 6579 (2002), a solução pode ser estocada à temperatura ambiente por até oito meses. O BAM/FDA (2001) recomenda seis meses. O BAM/FDA (2001) recomenda ainda que seja utilizado o verde de malaquita oxalato da Merck, porque outras marcas podem não ser efetivas.

Meio completo (formulado no laboratório)\*

Solução A	1000mL
Solução B	100mL
Solução C	10mL
pH 5,2±0,2 – 115°C/15min	

\*A preparação dos equivalentes comerciais é diferente, devendo ser seguida a orientação do fabricante

Preparação do meio completo: Para preparar o meio completo, juntar 1 litro da solução A, 100mL da solução B e 10 mL da solução C, ajustando o pH pH 5,2±0,2. Distribuir em tubos 16X150mm com tubo de Durham (aproximadamente 10mL/tubo) ou em frasco com a quantidade requerida para o uso. Esterilizar a 115°C/15min. A ISO 6579 recomenda estocar 3±2°C até o momento do uso e usar no mesmo dia. O BAM/FDA (2001) recomenda estocar sob-refrigeração por até um mês.

## SC

### CALDO SELENITO CISTINA

**Aplicação:** Caldo para enriquecimento seletivo de *Salmonella* nos alimentos.

### Composição

Triptona	5g
Lactose	4g
Fosfato dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	10g
Selenito ácido de sódio	4g
L-Cistina	0,01g
Água destilada	1litro
pH 7,0±0,2 – Fervura/10 min	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes na água destilada acertar o pH em 7,0, distribuir em tubos de 16X15mm (10mL/tubo) e submeter à fervura por 10 minutos. Não autoclavar. A altura do meio no tubo não deve ser inferior a 5cm, porque o meio é mais eficiente quando apresenta potencial de óxido-redução reduzido. Cuidado: Os sais de selenito são tóxicos quando inalados ou ingeridos. Manusear com cuidado, utilizando máscara.

### TGM

#### MEIO TIOGLICOLATO/FLUID THIOGLYCOLLATE MEDIUM

**Aplicação:** Meio manutenção de clostrídios e para verificação do requerimento de oxigênio para crescimento (aeróbio, anaeróbio facultativo, anaeróbio estrito)

### Composição

Peptona de caseína (digestão pancreática)	15g
Extrato de levedura	5g
Glicose	5,5g
NaCl	2,5g
L-cistina	0,5g
Tioglicolato de sódio	0,5g

Ágar	0,75g
Rezarzurina (0,01mL da solução aquosa 0,1%)	0,001g
Água destilada	1 litro
pH 7,1±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, aquecer até completa fusão do ágar, distribuir em tubos 16X15mm (10mL/tubo) e esterilizar a 121°C/15min.

## MLG

### MEIO DE LACTOSE GELATINA

**Aplicação:** meio para prova bioquímica, teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina para *Clostridium perfringens*.

### Composição

Triptose	15g
Extrato de levedura	10g
Lactose	10g
Vermelho de fenol (5mL da solução alcoólica 1%)	0,05g
Gelatina	120g
Água destilada	completar para 1 litro
pH 7,5±0,2 – 121°C/10min	

**Preparação:** Dissolver a triptose, o extrato de levedura e a lactose em 400mL de água destilada, aquecendo se necessário. Suspender a gelatina em 600ml de água destilada, aquecer até fusão. Juntar as duas soluções e ajustar o pH em 7,4±0,2 . Adicionar os 5mL da solução de vermelho de fenol e misturar bem. Distribuir em tubos de 15X15mm (10mL/tubo) e esterilizar a 121°C/10min. Se o meio não for usado no intervalo de oito horas depois do preparo, desaerar antes do uso, aquecendo em banho a 50-70°C/2-3h. **Solução 1% de vermelho de fenol:** Dissolver 1g em 100mL de etanol 95%.

**MEIO TESTE DE MOTILIDADE**

**Aplicação:** Meio semissólido para teste de motilidade.

**Composição**

Extrato de carne	3g
Peptona de caseína ou gelatina (digestão	10g
Cloreto de sódio (NaCl)	5g
Ágar	4g
Água destilada	1 litro
pH 7,3±0,2 – 121°C/15min	

**Preparação:** Suspender os ingredientes na água destilada e ajustar o pH em 7,2. Aquecer até a completa fusão do ágar, distribuir em tubos de 10X100mm (5mL/tubo) e esterilizar a 121°C/15min. Não inclinar, o meio deve solidificar na posição vertical.