

ANA LÚCIA MAGNANI

**EFEITO DO CRAVO (*Syzygium aromaticum*) SOBRE *Salmonella* E
Staphylococcus aureus EM SALAME TIPO ITALIANO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de “Magister
Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001**

ANA LÚCIA MAGNANI

**EFEITO DO CRAVO (*Syzygium aromaticum*) SOBRE *Salmonella* E
Staphylococcus aureus EM SALAME TIPO ITALIANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 28 de junho de 2001.

Prof^ª Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof^º Lúcio Alberto de M.Gomide
(Conselheiro)

Prof^ª Regina Célia Santos Mendonça

Prof^º Frederico José Vieira Passos

Prof^ª Maria Cristina Dantas Vanetti
(Orientadora)

Aos meus pais Dalmir e
Vera Lúcia pelo amor,
estímulo, incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em todos os momentos na realização deste trabalho.

Ao Marco pela compreensão, amor e carinho e pela atenção dispensada em todos os momentos difíceis.

A todos meus familiares, pelo estímulo em busca da realização profissional, em especial a tia Dólma e a vó Álida.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade da realização do curso.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

À Tripominas Comércio de Tripas e Salgado Ltda., representante comercial da Doremus Indústria e Comércio Ltda. em Belo Horizonte-MG e à DANN Alimentos (São Paulo, SP) pelo fornecimento dos condimentos utilizados nesse estudo.

À Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela orientação, amizade, dedicação, confiança e todo o seu empenho na realização desse trabalho.

À Professora Célia Alencar de Moraes pela amizade, pelo incentivo e pela atenção dispensada em todos os momentos em que foi solicitada, e também pela sua colaboração e sugestões para a realização deste trabalho.

Ao Professor Frederico José Vieira Passos pelas valiosas sugestões.

Ao Professor Lúcio Alberto de Miranda Gomide, pela colaboração e sugestões.

À Professora Regina Célia Santos Mendonça pela colaboração, auxílio nos momentos oportunos e pelas conversas sempre agradáveis.

A todos os Professores do Departamento de Microbiologia e Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos.

Aos funcionários José Carlos (Esquilo), Antônio, Paulo, Sebastião, Danilo, Evandro e José Reinaldo.

Às secretárias Nilcéia, Laura e Maria Aparecida, pelas boas conversas e pelo auxílio que sempre me foi dispensado.

Ao funcionário Wandick (DTA) pela árdua tarefa de me auxiliar sempre, com a maior boa vontade, no embutimento dos salames produzidos para esse experimento.

Aos estagiários Esther, Viviane e Uelinton, pela ajuda na preparação de materiais e pela ótima convivência.

Ao Fábio e à Virgínia pelo auxílio e boa vontade para realização de análises no HPLC.

A Audecir e Marli pelos ensinamentos e amizade, o começo de tudo na Microbiologia.

A Marceli e a Sólon pelo companheirismo, apoio, amizade e paciência nas horas difíceis de Viçosa.

Aos amigos Wanessa, Simone, Cláudia, Cláudia Lúcia, Adão, João Júlio, Maurício, Kérlei, Waléria, Eliseth, Raquel e a todos os colegas que, de uma forma ou de outra, auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos amigos de Chapecó: Luciana, Ana Cecília, Lúcia, Jorge, Miriam e Sara pelo incentivo.

A todos que, de alguma maneira, possibilitaram a realização deste.

BIOGRAFIA

ANA LÚCIA MAGNANI, filha de Dalmir Sebastião Magnani e Vera Lúcia Magnani, nasceu em Florianópolis, Estado de Santa Catarina, em 18 agosto de 1973.

Em março de 1994, ingressou na Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) onde, em 19 de setembro de 1998, colou grau em Ciências Biológicas.

Em abril de 1999, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em 28 junho de 2001.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Microrganismos	16
3.2. Preparo do inóculo.....	17
3.3. Condimentos	17
3.4. Processamento do salame tipo italiano	17
3.5. Maturação do embutido	18
3.6 Determinações físico-químicas	19
3.7 Análises microbiológicas do salame	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Concentração de eugenol no cravo-da-índia	22
4.2 Variação do pH no salame tipo italiano.....	22
4.3 Concentração de ácido láctico no salame tipo italiano.....	24
4.4 Atividade de água no salame tipo italiano.....	25
4.5 Umidade estimada no salame tipo italiano.....	26

4.5 Efeito de 0,2% de cravo-da-índia sobre <i>Salmonella</i> em salame tipo italiano	27
4.6 Efeito de 0,2% de cravo-da-índia sobre <i>Staphylococcus aureus</i> em salame tipo italiano	30
5. RESUMO E CONCLUSÕES	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

MAGNANI, Ana Lúcia, M.S., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2001. **Efeito do cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em salame tipo italiano.** Professora Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Professores Conselheiros: Lúcio Alberto de Miranda Gomide e Célia Alencar de Moraes.

Foi avaliado o efeito do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* inoculados em salame tipo italiano na concentração de, aproximadamente, 10^3 a 10^4 UFC/g do produto. O pH final do salame tipo italiano foi em torno de 4,4 e a concentração de ácido láctico variou de $65,9 \text{ mmolL}^{-1}$ no início do processamento para $249,4 \text{ mmolL}^{-1}$ ao final de 20 dias. Os salames processados neste estudo resultaram num produto final com a_w de, aproximadamente, 0,91 e um percentual de umidade estimada de 49,1%. A adição de 0,2% de cravo no salame não resultou em diferenças significativas nas características físico-químicas do produto, com exceção do pH que foi mais baixo nos embutidos adicionados de cravo. Foi constatado que, nos salames tipo italiano fabricados com a adição de 0,2% de cravo, compreendendo $65 \mu\text{g}$ de eugenol por grama de produto, e naqueles salames do tratamento controle, sem cravo, houve uma redução de até quatro ciclos logarítmicos no número de células viáveis de *Salmonella*. O número de ciclos logarítmicos reduzidos na população de *Salmonella* foi significativamente maior

($p < 0,05$) nos embutidos produzidos com 0,2% de cravo, quando se utilizou o meio BPLS para a contagem de colônias típicas de *Salmonella*. Ao final de 20 dias de processamento do salame tipo italiano não foi possível detectar a presença de *Salmonella* no produto adicionado de 0,2% de cravo, pela técnica do Número Mais Provável (NMP) nem por método imunológico. Pela técnica de imunoenzyme em apenas uma, das quatro repetições do tratamento controle, sem a adição de cravo, pode ser constatada a presença de *Salmonella* nos embutidos prontos. O número de células viáveis de *S. aureus* reduziu aproximadamente, meio ciclo logarítmico no período de fermentação. Os resultados mostraram que a adição de 0,2% de cravo no salame tipo italiano, nas condições experimentais usadas, não resultou em efeito inibidor adicional sobre *S. aureus* durante o período de processamento do produto.

ABSTRACT

MAGNANI, Ana Lúcia, M.S., Universidade Federal de Viçosa, June, 2001. **Effect of clove (*Syzygium aromaticum*) on *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* into Italian salami.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Committee members: Lúcio Alberto de Miranda Gomide and Célia Alencar de Moraes.

The effect of clove (*Syzygium aromaticum*) on *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* inoculated into Italian salami at, approximately, 10^3 to 10^4 CFU/g of finished salami was studied. Lactic acid concentrations varied from 65.9 mmolL^{-1} , at the beginning of processing, to 249.4 mmolL^{-1} at the end, after 20 days, when a final pH of about 4.4 was recorded. Finished salami had an approximate a_w of 0.91 and an estimated moisture content of 49.1%. Except for the lower pH values recorded, the addition of clove at 0.2% to the salami did not result in significant changes in the physical and chemical characteristics of the product. In the Italian salami prepared with clove at 0.2%, a concentration equivalent to $65 \mu\text{g}$ eugenol per gram of salami, and in the control treatment without clove, a reduction of up to four logarithmic cycles in the numbers of viable cells of *Salmonella* was observed. This reduction was significantly higher ($p < 0.05$) in the product prepared with clove at 0.2% when the BPLS medium was used for counting typical *Samonella* colonies. At the end of 20 days of processing, *Salmonella* could not be detected in the salami containing clove at 0.2% either by the most probable number technique (MPN) or by immunoanalytical methods. The use of immunoanalyses allowed the detection of *Salmonella* in the finished product in only one of the four replications of the control treatment. The numbers of viable *S. aureus* decreased half

a logarithmic cycle during fermentation. These results showed that, under the experimental conditions tested, the addition of clove at 0.2% to Italian Salami did not cause any additional inhibition of *S. aureus* during salami processing.

1. INTRODUÇÃO

A fabricação de embutidos curados e fermentados representa um segmento importante da industrialização de carnes. A produção nacional está concentrada, principalmente, na região Sul do Brasil e esse setor tem enfrentado muitos problemas técnicos, tendo como consequência, grandes perdas econômicas. Sendo o salame tipo italiano um produto fermentado e pronto para o consumo, ou seja, não necessita de nenhum tratamento térmico antes de ser consumido, é muitas vezes responsável pela veiculação de patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria* e *Escherichia coli*, dentre outros. A presença de microrganismos contaminantes indesejáveis e a utilização de processos industriais inadequados podem promover a alteração do sabor característico do produto, comprometendo sua qualidade e segurança.

Dada a importância do setor, são fundamentais os investimentos em pesquisas que visem o melhoramento dos processos industriais, eliminando, assim, o risco de veiculação de patógenos e de substâncias tóxicas preservando as características sensoriais de produtos cárneos fermentados. Com esse objetivo, o Departamento de Microbiologia e o Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, vêm realizando uma série de trabalhos ao longo dos últimos anos, alcançando resultados importantes para a indústria de produtos cárneos. Cita-se, como exemplo, a confirmação da redução do tempo de

fermentação e a redução do número de células viáveis de *S. aureus* do salame tipo italiano pelo uso de culturas *starter* ativadas ou diretamente adicionadas à massa do salame e a avaliação do comportamento de patógenos como *Yersinia enterocolitica* durante a fabricação e maturação do salame tipo italiano. Além disso, isolaram-se bactérias lácticas a partir de salames com objetivo de avaliar o seu potencial para serem usados como culturas *starter*. A presença de patógenos como *S. aureus*, *Salmonella* e *Klebsiella pneumoniae* em embutidos fermentados secos foi detectada e os resultados indicaram a necessidade de adoção de técnicas de processamento que garantam a segurança do produto. Resultados mostraram que o uso de misturas específicas de condimentos pode resultar na inibição de patógenos, como *Listeria monocytogenes*, que, geralmente, apresenta-se com resistência elevada a condições adversas. Estudos de avaliação sensorial do produto adicionado de condimentos com atividade antimicrobiana também têm sido conduzidos e indicam que a presença de baixas concentrações de cravo não afeta a aceitabilidade do salame tipo italiano.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo contribuir com informações adicionais sobre o uso de cravo na mistura de condimentos na inibição de *Salmonella* e *S. aureus* inoculados na massa do salame tipo italiano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A produção de salame é um dos métodos mais antigos de conservação de carnes desenvolvido pelo homem e, segundo MARCHESINI et al. (1992), embora exista uma grande variedade de salames produzidos em todo o mundo, a tecnologia empregada na fabricação de muitos desses produtos é, essencialmente, similar. Os salames fermentados são alimentos tradicionais na Europa central e meridional-central e resultam da fermentação láctica da mistura de carne, gordura, sal, agentes de cura, como nitrato, e ou nitrito e condimentos (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). O produto, submetido a diferentes processos de fermentação e secagem, apresenta características finais dependentes das condições termohigrométricas de cada região e dos ingredientes utilizados (BALDINI et al., 2000). A classificação desses produtos é realizada de acordo com alguns critérios, tais como: composição, calibre, grau de moagem dos ingredientes, condimentos e temperos adicionados, defumação ou não e duração do período de maturação (ORDÓÑEZ et al., 1999).

Como não são submetidos a tratamento térmico, a segurança microbiológica desses produtos depende da combinação de vários métodos de conservação baseados em fatores como pH baixo, atividade de água baixa, presença de cloreto e nitrato de sódio e outros agentes antimicrobianos adicionados durante o processamento ou produzidos durante o processo

fermentativo (BACUS e BROWN, 1981; BACUS, 1984; ASPLUND et al., 1993; MARES et al., 1994).

A preservação de alimentos pela fermentação depende do princípio da oxidação de carboidratos e derivados para a geração de produtos finais como ácidos, álcool e dióxido de carbono (CAPLICE e FITZGERALD, 1999). O processo de fermentação de produtos cárneos é caracterizado por transformações microbiológicas e bioquímicas importantes que podem ser resumidas em: alteração da microbiota inicial, diminuição do pH, redução do nitrato a nitrito e, posteriormente, a óxido nitroso, formação de nitrosomioglobina, solubilização e gelificação de proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares, além de fenômenos oxidativos, proteolíticos e lipolíticos (LIZASO et al., 1999).

Para que ocorra o processo de fermentação e maturação, os salames devem ser pendurados verticalmente em câmaras de maturação, por um período de duas a quatro semanas, em condições controladas de temperatura e umidade (MARCHESINI et al., 1992). Para a fase de fermentação, utiliza-se temperaturas entre 22 e 25°C, durante dois a três dias. Essa temperatura irá favorecer o desenvolvimento da microbiota responsável pela fermentação dos açúcares. Na fase de maturação, a temperatura entre 12 a 15°C, associada a um regime de umidade relativa decrescente, assegura que a atividade de água seja reduzida ao final do processamento até um valor tal que o produto apresenta-se estável em temperatura ambiente (MARCHESINI et al., 1992).

A fermentação de carnes envolve a conversão de açúcar, glicose ou sacarose dentre outros, adicionado na formulação do salame, primariamente a ácido láctico, pelo processo homofermentativo pelas bactérias do ácido láctico, com conseqüente redução do pH (BACUS, 1982). Essa redução varia de um valor inicial de 5,8 a 6,2 para valores próximos ou abaixo de 5,0 (NISSEN e HOLCK, 1998; ORDÓÑEZ et al., 1999). A formulação específica do produto e as condições de processamento influenciam diretamente a taxa de fermentação e, conseqüentemente, o pH final do produto (BACUS, 1982). Esse pH final irá depender de uma série de fatores como: quantidade de carboidrato disponível, tempo de fermentação, temperatura e umidade relativa durante a fermentação

(LONERGAM e MANDIGO, 1993), do tipo de açúcar utilizado na formulação (BACUS, 1982) e da atividade da cultura *starter* empregada (BACUS, 1986). O leite em pó e outros pós adicionados à massa também podem diminuir o tempo de fermentação por se ligarem à água livre (BACUS, 1982).

O ácido láctico é o produto metabólico mais importante gerado no processo fermentativo, sendo um dos principais agentes responsáveis pela segurança microbiológica e qualidade dos produtos cárneos fermentados. Além desse efeito antimicrobiano, o abaixamento do pH pela produção de ácido láctico é um fator importante na coloração final do produto. As bactérias geralmente utilizadas como culturas *starter* possuem enzimas denominadas nitrato-redutase e nitrito-sintetase, que são importantes na conversão do nitrato e nitrito, respectivamente. O nitrato é convertido a nitrito, que por sua vez, é convertido a óxido nitroso que, quando combinado com a mioglobina, é responsável pela coloração final do produto. A queda do pH acelera o processo de passagem de nitrito para óxido nitroso e portanto, a formação da coloração do produto (TERRA, 1993a). O ácido ascórbico utilizado no processamento do salame funciona como um estabilizador e acelerador do pigmento da carne curada, atuando com agente redutor (PIVNIC, 1980).

Além de influenciar na cor do embutido, a atividade metabólica de microrganismos produtores de ácido láctico também contribui para a formação de outras características sensoriais do produto. O abaixamento do pH confere um sabor picante ao *flavor* final do produto, além de alterar a textura por meio de desnaturação das proteínas da carne (SMITH e PALUMBO, 1981).

A fermentação dos embutidos pode ocorrer de duas maneiras: 1) pela ação de microrganismos presentes na microbiota natural da carne, denominada de fermentação natural, possibilitando um desenvolvimento de características sensoriais mais suaves, porém aumentando o risco microbiológico; e 2) pela ação de culturas *starter* adicionadas, onde a fermentação ocorre de uma forma mais rápida, com a obtenção de uma maior segurança microbiológica (MENDONÇA, 2000).

As culturas *starter* usadas na fabricação de embutidos fermentados apresentam como funções principais a inibição do crescimento de microrganismos indesejáveis e a redução do tempo de fermentação, melhorando a qualidade final do produto. Essas melhoras resultam na uniformização dos lotes produzidos, na redução dos riscos de perdas e no aumento da garantia de segurança dos produtos (MENDONÇA, 2000). O uso de culturas *starter* em produtos cárneos fermentados é relativamente recente, quando comparado com outros alimentos fermentados como leite, vegetais, bebidas e produtos de panificação (PROCHASKA et al., 1998).

Algumas características são desejáveis na cultura láctica para uso em carnes tais como ser tolerante ao cloreto de sódio, crescer em presença de 100 ppm de nitrito, ser homofermentativa e não produzir compostos associados ao *off-flavor* (LONERGAM e MANDIGO, 1993).

Dentre as principais culturas *starter* utilizadas na fermentação de carnes, destacam-se *Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus plantarum* (LONERGAM e MANDIGO, 1993). Além dessas, podem ser citadas: *Staphylococcus* não patogênicos, *Micrococcus varius* que também têm sido empregadas, com sucesso, no processo de fabricação do salame (TERRA, 1993a).

As culturas *starter* devem ser adicionadas, rotineiramente, na massa do salame para obter uma contagem mínima de 10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama do produto. Esse número inicial assegura a predominância da cultura *starter* sobre algum tipo de microrganismo indesejável presente (BACUS, 1993).

A maturação do salame fermentado é caracterizada por uma série de reações envolvendo proteínas, carboidratos e lipídeos. Diferentes produtos finais são formados como por exemplo: peptídeos e aminoácidos, ácidos láctico e acético e ácidos graxos livres, além de aldeídos, cetonas e ésteres que, juntos, contribuem para o *flavor* final do produto (JOHANSSON et al., 1994).

Durante a moagem da carne, as fibras musculares, que compreendem, aproximadamente, 80% dos constituintes celulares, são trituradas em maior ou menor extensão, sendo expostas à ação do sal. O cloreto de sódio facilita o

processo eletrostático envolvido na formação do filme de proteína que envolve as partículas de gordura e as interações proteína-gordura e proteína-proteína. Os íons interagem com as proteínas e reduzem as atrações eletrostáticas entre os íons com cargas opostas, promovendo um desdobramento e aumentando a solubilidade (ORDÓÑEZ et al., 1999). O pH mais baixo age auxiliando a desnaturação das proteínas solubilizadas pelo sal e os agregados de proteínas precipitam formando os géis de proteína (LONERGAM e MANDIGO, 1993). Deste modo, as condições para formação da estrutura tridimensional são gradativamente estabelecidas, influenciando a textura final destes produtos (ORDÓÑEZ et al., 1999). Além disso, o declínio do pH facilita a perda da umidade e contribui também para a textura do produto (LONERGAM e MANDIGO, 1993).

O processo de fermentação não é, por si só, suficiente para uma eliminação completa da contaminação inicial da carne por microrganismos alteradores e patógenos e garantir inocuidade do produto. Entretanto, segundo UPTON (1995), atua auxiliando na redução ou controle dessa microbiota contaminante.

É importante observar que, para a obtenção de um produto fermentado de qualidade, é necessário que a matéria-prima seja de boa qualidade microbiológica e que hajam práticas higiênicas adequadas durante todo o processamento (BACUS e BROWN, 1981; HOLLEY et al., 1988; LONERGAM e MANDIGO, 1993).

A ocorrência de surtos de intoxicações e infecções alimentares em razão do consumo de salames fermentados contaminados é uma confirmação de que o risco deve ser monitorado e medidas preventivas devem ser adotadas. Além disso, a detecção de diversos patógenos em salames fermentados obtidos no comércio e a constatação experimental da sobrevivência desses patógenos no produto indicam a necessidade da adoção de medidas adicionais que promovam a inativação ou a inibição de microrganismos que possam causar riscos para a saúde do consumidor.

Salames têm sido envolvidos em surtos de intoxicação por *Staphylococcus aureus* (METAXOPOULOS et al., 1981; BACUS, 1986) e infecção por *Salmonella* (Taplin, 1982, citado por ICMSF, 2000). Cowden et al.

(1989), citados por ICMSF (2000), relatam que tais doenças são consequência de uma fermentação imprópria que permite o crescimento de *S. aureus* e a sobrevivência de *Salmonella*. *Staphylococcus aureus* é uma preocupação primária em produtos fermentados, uma vez que essa bactéria é mais resistente a elevadas concentrações de sal do que as bactérias do ácido lático que são adicionadas à formulação do salame (BACUS, 1982). As bactérias lácticas são capazes de se desenvolverem em uma concentração de até 3,5% de cloreto de sódio na massa. Concentrações mais elevadas de sal de 4% a 5%, irão determinar a inibição das bactérias lácticas, possibilitando assim um maior desenvolvimento de *S. aureus* (TERRA, 1993b). Na ausência de competição efetiva, *S. aureus* pode se multiplicar e produzir toxinas nas fases iniciais da fermentação, tornando possível a ocorrência de surtos (METAXOPOULOS et al., 1981; BACUS, 1984; GALLI, 1993).

Na indústria de alimentos cárneos, tem-se procurado inibir o crescimento de *S. aureus*, e de outros patógenos pelo uso de culturas *starter* (BACUS, 1984; MARCY et al., 1985). Um crescimento rápido de bactérias lácticas durante os primeiros estádios de fermentação resulta em uma diminuição mais rápida do pH, minimizando assim os riscos de crescimento de *S. aureus* (METAXOPOULOS et al., 1981), que são inibidos em pH inferior a 5,3 (BACUS, 1984; BACUS, 1986; TERRA, 1993a).

Surtos de salmonelose associados com o consumo de embutidos secos são consequência de uma fermentação inadequada, resultando em produtos com o pH relativamente alto (BACUS, 1997). Muitas vezes, esse patógeno pode estar presente em ingredientes usados na formulação do produto (MASTERS et al., 1981). Entretanto, o crescimento de *Salmonella* pode ser inibido pelas condições frequentemente encontradas em embutidos fermentados secos, tais como pH baixo e atividade de água baixa (INCZE, 1998). A produção de ácido pela atividade das culturas *starter*, que resulta na redução do pH, parece ser o principal fator responsável pela inativação de *Salmonella* nesse tipo de produto (SMITH e PALUMBO, 1981). MASTERS et al. (1981) observaram que a utilização adequada de culturas *starter* em produtos cárneos, permitiu uma eliminação completa de *S. newport* e *S. typhimurium*. TURANTAS e

ÜNLÜTÜRK (1993) afirmaram que é difícil prever o comportamento *S. typhimurium* no produto cárneo fermentado preparado industrialmente, por causa da interação de diversos fatores como natureza da carne e de outros ingredientes, quantidade de oxigênio disponível, atividade de água, fermentação e temperatura de armazenamento. Porém, estudos realizados por essa mesma equipe de pesquisadores indicaram que uma cultura *starter* fisiologicamente ativa assegurará o decréscimo do pH necessário para a segurança do embutido fermentado, onde *S. typhimurium* é uma preocupação. Entretanto, GALLI (1993) afirmou que, mesmo com a utilização de culturas *starter*, a eliminação de patógenos não é totalmente garantida, pois *Salmonella* mesmo não apresentando crescimento, pode sobreviver no produto e ser causa de infecção alimentar. A constatação da presença de um baixo número de *Salmonella* ao final do período de processamento de embutidos fermentados (SMITH e PALUMBO, 1981), demonstra que, apenas a ação das bactérias do ácido lático não é suficiente para a obtenção de produtos livres de *Salmonella*

Estirpes enterohemorrágicas de *Escherichia coli* têm sido causa de doenças associadas ao consumo de embutidos fermentados. PATON et al. (1996) descreveu um surto causado por *E. coli* sorotipo O111:H, veiculada por embutido, denominado “mettwurst”, típico da região de Adelaide, no sul da Austrália. A estirpe *E. coli* O157:H7 também foi associada a um surto de infecção alimentar em razão do consumo de salame seco, nos Estados Unidos (CDC, 1995).

A literatura registra muitos trabalhos de detecção de patógenos em diferentes tipos de embutidos. HOLLEY et al. (1988) encontraram estafilococos enterotoxigênicos em todos os estádios de produção de salames Genoa e salametti, fabricados com a adição de culturas *starter*. FARBER et al. (1989) observaram que 20% das amostras de salames fermentados analisadas estavam contaminadas com *Listeria monocytogenes*. Sorotipos diferentes de *Salmonella* têm sido encontrados em produtos cárneos fermentados preparados sem culturas *starter* ou em produtos com curtos períodos de fermentação (Gaier, 1995, citado por NISSEN e HOLCK, 1998). TRISTÃO (1998) isolou diversas enterobactérias de salame tipo italiano produzidos comercialmente com adição de cultura *starter*, dentre as quais destacam-se *Salmonella* e *E. coli*. BORGES et al. (1999), avaliando a presença de *L. monocytogenes* em 81 amostras de quatro tipos

diferentes de embutidos fermentados (Friolano, Hamburguês, Italiano e Milano), comercializados no Rio de Janeiro, demonstraram que 13,3% das amostras do salame tipo italiano estavam contaminadas com *L. monocytogenes*.

A presença de coliformes em produtos cárneos fermentados também é um importante fator que deve ser considerado (VIGNOLO et al., 1989). A presença de *E. coli* em salames fermentados secos está associada com problemas sérios de higiene nas etapas dos processos produtivos, uma vez que essa bactéria, geralmente associada à contaminação de produtos crus, usualmente desaparece no produto fermentado em decorrência do efeito do pH, temperatura e atividade de água baixos (INCZE, 1998).

GLASS et al. (1992) observaram que a inoculação de uma população inicial alta de *E. coli* O157:H7 em salame seco fermentado, resultou na detecção de sobreviventes após a fermentação, maturação e estocagem do produto.

SIQUEIRA (1992) avaliou a sobrevivência de *Yersinia enterocolitica* inoculada no salame tipo italiano. Foram isoladas 60 colônias típicas do patógeno até o sétimo dia de processamento, mas somente 16 colônias foram confirmadas como *Y. enterocolitica*, todas elas isoladas no dia do processamento. As limitações da técnica de isolamento, não permitiram que esse estudo fosse conclusivo.

MENDONÇA (1992) avaliou o crescimento de *S. aureus* em salame tipo italiano e os percentuais de inibição observados foram de 99,67% no produto onde se usou culturas *starter* previamente ativadas, e de 98,13% no produto inoculado diretamente com culturas *starter* liofilizadas.

A redução da contaminação por coliformes fecais ao longo do processo fermentativo de salame tipo italiano foi observada por FONSECA (1999) e pode ser atribuída à associação das condições adversas estabelecidas durante a fermentação, ressaltando-se a redução rápida de pH em razão da produção de ácidos pelas bactérias lácticas, adicionadas ou não na massa do embutido. A autora constatou ainda a redução de dois ciclos logarítmicos na população de *L. innocua*, nos três primeiros dias de fermentação, no produto adicionado de culturas *starter*. O número dessa bactéria, usada com indicadora de *L. monocytogenes* foi reduzido no produto final, mas não suprimido devido à alta contagem inicial cerca de 10^5 UFC por grama de massa do embutido.

A sobrevivência de patógenos por um longo período no produto demonstra a necessidade de um controle microbiológico mais adequado durante todas as etapas do processamento.

Na preparação de embutidos curados, diversas especiarias ou condimentos são adicionados. Estima-se que, pelo menos a metade do total de condimentos utilizados pela indústria nos Estados Unidos é pela indústria de produtos cárneos, principalmente a de embutidos (SHELEF, 1983). Embora a função principal deles seja contribuir para o sabor desses embutidos, as especiarias são uma fonte de várias outras substâncias como açúcares fermentáveis e redutores, nitrato e nitrito, pigmentos, íons metálicos, entre outros. Essas substâncias são conhecidas por apresentarem influência no desenvolvimento da textura, *flavor* e coloração durante a etapa de maturação do embutido.

As especiarias também possuem atividade antimicrobiana importante (ZAIKA e KISSINGER, 1979; PANDIT e SHELEF, 1994; AGUIRREZÁBAL et al., 1998). Os condimentos afetam todas as fases de crescimento microbiano: a fase lag é estendida; durante a fase logarítmica ocorre uma redução na taxa de crescimento e o rendimento total da célula é reduzido (SHELEF, 1983). Deve ser ressaltado que, em alimentos processados com condições sanitárias adequadas, contendo baixas populações microbianas, o efeito antimicrobiano dos condimentos pode oferecer uma proteção substancial contra fungos, bactérias Gram-positivas e, até certo ponto, também contra bactérias Gram-negativas (SHELEF, 1983). Muitos estudos relatam o efeito inibidor de condimentos sobre esporos e sobre células vegetativas em associação com conservantes usados no processamento de alimentos.

Os componentes antimicrobianos dos condimentos, na sua maioria são compostos fenólicos com massa molecular de 150 a 160 KDa, contendo um grupo hidroxil. Eugenol, carvacrol e timol têm sido identificados como principais componentes antimicrobianos em cravo, canela, sálvia e orégano (SHELEF, 1983). Os óleos essenciais e outros componentes de ervas e condimentos são usados extensivamente na preparação de alimentos, sendo muitos desses classificados como GRAS - "Generally Recognized as Safe" (KIM et al., 1995; HAO et al., 1998). Além da comprovada atividade antimicrobiana de alguns condimentos, o poder antioxidante é outra propriedade de interesse para alimentos que deve ser ressaltada. Para AL-JALAY et al. (1987) o eugenol, principal constituinte ativo do óleo essencial do cravo, é um dos mais potentes antioxidantes entre alguns óleos essenciais.

Para HAO et al. (1998), o uso de tais produtos vegetais pode prover uma barreira adicional ao crescimento de patógenos. ARORA e KAUER (1999) demonstraram que algumas bactérias resistentes a certos antibióticos foram sensíveis a extratos de alho e cravo-da-índia. As respostas de diferentes microrganismos a uma determinada especiaria varia consideravelmente, dependendo do tipo de condimento utilizado (ZAIKA et al, 1978). Os condimentos tipicamente utilizados na formulação do salame apresentam efeitos diretos na taxa de fermentação, estimulando a produção de ácidos pelas bactérias. ZAIKA et al., (1978) concluíram que, dependendo da mistura de condimentos utilizada, ocorre uma aceleração da produção de ácido láctico pelas culturas *starter* ou pela microbiota láctica naturalmente presente na carne, durante a fermentação. Essa estimulação não é acompanhada de um aumento da população bacteriana e não é consequência de nenhuma contaminação do condimento (BACUS, 1982). Os condimentos agem como ativadores do metabolismo das bactérias lácticas, o que se deve, provavelmente, à presença do íon manganês nas especiarias (ZAIKA e KISSINGER, 1984). Essa produção rápida de ácido nos primeiros estádios da fermentação é desejável porque controla o crescimento de microrganismos patogênicos que podem estar presentes no produto (ZAIKA e KISSINGER, 1984).

ZAIKA e KISSINGER (1979) demonstraram o efeito de diferentes concentrações de cravo sobre a produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus cerevisiae*. Nesse experimento, foi observado que concentrações baixas do condimento estimularam a produção de ácido láctico em ambas as culturas, mas em maior extensão, pelo *L. plantarum*. O aumento da concentração de cravo apresentou ação inibitória para ambas as culturas, enquanto que a concentração de 8g/L apresentou efeito bactericida.

ZAIKA e KISSINGER (1984) avaliaram diversos condimentos quanto ao efeito sobre a produção de ácido láctico pelas bactérias *starter* e concluíram que o cravo, por apresentar uma quantidade maior do íon mangânes em sua composição, é capaz de apresentar maior efetividade do que outros condimentos estudados. CARMO (1999) também constatou que salame tipo italiano processado com 0,2% de cravo apresentou maior concentração de ácido láctico do que aqueles processados sem adição de cravo.

Entretanto, um fator que deve ser considerado é que o uso de condimentos como antimicrobianos em alimentos muitas vezes é limitado por alterações no sabor e no odor, pois concentrações antimicrobianas efetivas desses condimentos podem exceder os níveis sensoriais aceitáveis (PANDIT e SHELEF, 1994). Geralmente, por possuírem

uma composição mais complexa, os alimentos requerem maiores concentrações de conservantes para que haja efeito inibitório do crescimento de microrganismos. Estudos realizados com alimentos comprovam que a quantidade de condimento adicionada para se obter um efeito inibitório contra microrganismos é bem maior do que a quantidade utilizada para se obter o mesmo efeito em meios de cultura (SHELEF, 1983). Entretanto, combinações de condimentos que possuem atividade antimicrobiana, associadas a outros fatores inibidores, podem aumentar a vida-de-prateleira do alimento e sua segurança microbiológica (PANDIT e SHELEF, 1994).

A atividade antimicrobiana dos condimentos depende de vários fatores como composição e concentração do condimento empregado, espécie e número de microrganismos contaminantes presentes, composição do substrato e condições de tratamento e de estocagem do condimento (BACUS, 1982). Muitos dos estudos que relatam o efeito inibidor de condimentos sobre microrganismos têm sido conduzidos *in vitro*. Conseqüentemente, poucas informações existem em relação a extratos antimicrobianos utilizados em sistemas alimentares (HAO et al., 1998). Apesar disso, alguns resultados obtidos em estudos da utilização de condimentos em alimentos confirmam o potencial dos mesmos como agentes antimicrobianos (PANDIT e SHELEF 1994; CARMO, 1999).

CARMO (1999) constatou uma inibição de *L. innocua* no salame tipo italiano fabricado com mistura contendo 0%, 0,1% e 0,2% de cravo e demais condimentos. Nos embutidos com adição de cravo essa redução foi de, aproximadamente, um e meio ciclo logarítmico e, nos embutidos sem a adição desse condimento, essa redução foi menor do que um ciclo logarítmico.

Além da presença de patógenos, substâncias tóxicas podem estar presentes ou serem formadas durante a maturação dos embutidos fermentados, como as aminas biogênicas (CHANDER et al., 1989). Essas são assim denominadas por serem formadas pela ação de microrganismos vivos com capacidade de produção de descarboxilases (CHANDER et al., 1989; SAGUÉS et al., 1998). As aminas biogênicas mais importantes que ocorrem em alimentos são a histamina, putrescina, cadaverina, tiramina, triptamina, β -feniletilamina, espermina e espermidina (SHALABY, 1996).

Aminas biogênicas têm sido implicadas em intoxicações por alimentos geralmente fermentados como queijo, produtos cárneos e vinho tinto (LIANO et al., 1998). Altas concentrações de histamina têm sido encontradas em salame fermentado pela fermentação natural durante o período de maturação (BERWAL e KUMAR, 1998). Os embutidos fermentados oferecem condições favoráveis para a formação de aminas biogênicas uma vez que os fatores principais requeridos estão presente, como, por exemplo, crescimento de microrganismos e reações de proteólises, resultando na liberação de aminoácidos, que são os precursores para a formação de aminas biogênicas, e, finalmente, a existência de um ambiente ácido que pode favorecer a atividade de descarboxilação dos aminoácidos pelos microrganismos (BOVER-CID et al., 1999a). Culturas de bactérias do ácido láctico são extensivamente usadas como *starter* para fermentação de carnes para que haja uma acidificação rápida e garantia da segurança do produto. Por outro lado, as condições de processo podem afetar o crescimento e a atividade de microbiota naturalmente presente ou adicionada, resultando em maior atividade proteolítica, que renderá aminoácidos precursores e, conseqüentemente, aumentando a capacidade de formação de aminas biogênicas (BOVER-CID, 1999b). Enzimas aminoácido descaboxilases têm sido encontradas em representantes das *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Pseudomonas*, dentre outras (SHALABY, 1996).

A formação de aminas em alimentos pode estar diretamente relacionada com as condições de higiene da matéria-prima e suas condições de processamento, e a detecção dessas pode servir como indicador de qualidade em produtos cárneos fermentados (EEROLA et al; 1998). A presença de aminas biogênicas pode ser controlada em salames fermentados pelo rígido emprego de boas condições de higiene, tanto na matéria-prima, quanto no ambiente de processamento, e pelo uso de fermentação rápida empregando culturas *starter* livres de aminoácido descaboxilases (SMITH e PALUMBO, 1983).

A presença de aminas biogênicas em alimentos constitui uma preocupação de saúde pública devido a seus efeitos fisiológicos e toxicológicos (BOVER-

CID, 1999b). Algumas aminas formadas são vasoconstritoras, desencadeando crises hipertensivas e também causam alterações no sistema nervoso, dentre outros sintomas. Outras, por reagirem com o nitrito e formarem nitrosaminas, são consideradas potencialmente carcinogênicas (SHALABY, 1996).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Microbiologia (DMB/UFV) e no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFV) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais.

3.1. Microrganismos

Foi utilizada uma cultura mista de *Staphylococcus xylosum* e *Pediococcus pentosaceus* (SPX), gentilmente cedida pela empresa Christian Hansen na forma liofilizada. Essa cultura foi escolhida por apresentar maior produção de ácido em caldo APT na presença de condimentos, segundo demonstrado por CARMO (1999).

A cultura de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi obtida do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DMB/UFV) e *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium utilizada é de origem humana, isolada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG). As culturas foram mantidas em ágar Infusão de Cérebro e Coração - BHI (Difco) semi-sólido, sob refrigeração, com renovação mensal.

3.2. Preparo do inóculo

A cultura mista de *S. xylosum* e *P. pentosaceus* (SPX) foi ressuspensa em água estéril e adicionada à massa do salame, conforme recomendações do fabricante.

Antes do início de cada repetição as culturas de *S. aureus* e *S. enteritidis* foram ativadas em 4 mL de caldo Triptcaseína e Soja - TSB (Merck) a 35°C, por duas vezes consecutivas, com intervalo de 18 horas. Após esse período, 50 µL de cada cultura foram transferidos para um mesmo frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de solução salina 0,85%, para se obter número de células de, aproximadamente, 10⁶ UFC/mL de cada um dos patógenos.

3.3. Condimentos

Os condimentos alho, pimenta branca e noz moscada foram adicionados ao salame na forma de pó e foram fornecidos pela Tripominas Comércio de Tripas e Salgado Ltda., representante comercial da Doremus Indústria e Comércio Ltda. em Belo Horizonte-MG. O cravo-da-índia moído foi fornecido pela DANN Alimentos (São Paulo, SP).

3.4. Processamento do salame tipo italiano

O salame tipo italiano foi processado no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA/UFV). Para a fabricação do embutido foi obedecida a seguinte formulação: 65% de carne suína (pernil) congelada; 20% de toucinho congelado e 15% de carne bovina congelada (acém). Em relação a esta massa cárnea, foram utilizados os seguintes ingredientes não cárneos: 3,0% de leite em pó; 2,5% de NaCl; 1,25% de glicose; 140 ppm de nitrito (NaNO₂); 100 ppm de nitrato (NaNO₃); 540 ppm de ácido ascórbico; 0,2% de alho; 0,4% de noz moscada; 0,2% de pimenta branca e, quando mencionado, 0,2% de cravo.

As carnes bovina, suína e o toucinho foram moídas em moedor de bancada, tipo açougue (Skywsem®) com discos de 8 milímetros; a carne bovina e suína por duas vezes consecutivas e o toucinho, uma vez. As carnes foram transferidas para uma misturadeira (Christiano Arthur Frederich & Cia Ltda) e, em seguida, foram adicionados os ingredientes não-cárneos, misturando-se por, aproximadamente, três minutos.

O experimento consistiu de um tratamento controle, sem adição de cravo na mistura de condimentos, e um tratamento contendo 0,2% de cravo em sua formulação, ambos adicionados de culturas *starter*. Antes da inoculação da massa do salame com os patógenos, foram coletadas amostras de 25g para análise de *Salmonella* e *S. aureus*

No Laboratório de Microbiologia de Alimentos/DMB, a massa do embutido foi incorporada de 50 mL de uma suspensão contendo uma mistura de células de *Salmonella* e *S. aureus*, de modo que cada patógeno alcançasse uma população de cerca de 10^3 a 10^4 UFC/g do embutido. Adicionou-se também, a cultura *starter* ressuspensa em 15 mL de água estéril para que se alcançasse, aproximadamente, 10^7 UFC/g do produto, como recomendado pelo fabricante. A mistura das culturas bacterianas na massa do salame foi feita manualmente, usando-se luvas estéreis por um tempo aproximado de dez minutos. A mistura foi, então, refrigerada por, aproximadamente, 24 horas para facilitar a interação entre os componentes. Após este período de pré-maturação, a massa do salame foi embutida em tripa de celulose I Back 45 (Clariant Comercial) de 60 milímetros de diâmetro, originando embutidos de cerca de 300 gramas.

O experimento foi conduzido em quatro repetições. Para cada repetição, foram processados, aproximadamente, 15 kg de salame tipo italiano.

3.5. Maturação do embutido

Os embutidos processados foram transferidos para uma câmara incubadora BOD, modelo 347 CD (Fanem) a uma temperatura entre 22 e 24°C e com uma umidade relativa (UR) entre 80 e 90%, para que ocorresse a fermentação. Considerou-se a fase de fermentação o tempo correspondente ao abaixamento do pH para valores menores ou próximos a 5,0. O pH foi medido durante os primeiros dias de processamento do salame. A partir do 3º dia, a temperatura foi gradativamente reduzida para 12 a 13°C e a umidade foi abaixada para 70 a 75%. A maturação foi completada em, aproximadamente, 20 dias. A umidade foi controlada com sílica e água destilada, e estimada usando-se um termômetro de bulbo úmido e bulbo seco tipo JIZ Z8806

(ASAHI). O salame foi considerado maturado quando esse apresentou umidade estimada de aproximadamente 49,1%.

3.6 Determinações físico-químicas

As análises de pH, ácido láctico, atividade de água (a_w) e umidade foram realizadas nas amostras de embutidos coletadas na segunda, terceira e quarta repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para determinação do pH foram adicionados 10 gramas do produto em 20 mL de água destilada. Após a homogeneização em “Stomacher” (Laboratory Blender 400, Seward), foi feita a leitura em potenciômetro Digimed DM 20.

A concentração de ácido láctico no embutido fermentado seco foi acompanhada durante todo o processo. As amostras foram diluídas, numa proporção de 1:10, com água deionizada (Sistema Miliqui, Millipore), para obtenção de concentrações entre os valores de 5 e 25 mmolL⁻¹ de ácido láctico, filtradas em papel filtro, centrifugadas por duas vezes em centrífuga refrigerada (Sorvall RT 6000 D) por 7,5 minutos a 20°C a 2200 g. O sobrenadante foi, então, filtrado em membrana (Schleicher & Schull) com poros de 0,2 µm de diâmetro.

A determinação de ácido láctico foi conduzida, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em aparelho Hewlett Packard (HP) Serie 1050M, utilizando-se uma coluna Aminex HPX – 87H (BioRad Laboratories, Richmond, Calif), a 60°C. O tempo de análise de cada amostra, contando a partir da injeção de 20 µL no aparelho, foi de 17 minutos. A coluna foi eluída com H₂SO₄ 0,005M, num fluxo de 0,7 mL/min.

A determinação da a_w foi baseada na determinação da umidade relativa de equilíbrio (URE) em analisador automático AquaLab, modelo CX₂ (Decagon Devires Inc.), pré-calibrado com soluções de cloreto de lítio (LiCl) com a_w de 0,500, cloreto de sódio com a_w de 0,760 e água destilada com a_w 0,998 na faixa de 22° a 24°C.

A umidade foi estimada, durante o processamento, pela perda de peso do salame, considerando-se que a carne possui, em média, 75% de umidade (JUDGE et al., 1989) e que a perda de peso se originou, exclusivamente, pela remoção de água do salame.

A concentração do eugenol, o princípio ativo do cravo-da-índia, foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em aparelho

Shimadzu LC-10Ai, equipado com um detector de ultravioleta de 220 nm. Amostras de 10 gramas do cravo, em triplicata, foram misturadas individualmente com 100 mL de etanol 95% e colocadas em agitador rotatório por um período de, aproximadamente, 18 horas, segundo WENDA KOON e SAKAGUCHI (1995). O extrato alcoólico foi centrifugado por três vezes em centrífuga refrigerada (Sorvall RT 6000 D), por 10 minutos a 20°C e 2200 g. O sobrenadante foi, então, filtrado em membrana (Schleicher & Schull) com poros de 0,2 µm de diâmetro e aplicado à coluna. Utilizou-se uma coluna Shim-pack CLC-ODS (M), com a fase móvel constituída de 1000 mL de K₂HPO₄ a 0,005 M adicionado de 10 mL de ácido ortofosfórico 8,5%, acetonitrila e metanol (9:6:1, v/v). O fluxo de eluição foi de 1 mL/min (FISCHER e DENGLER, 1990) com modificações.

Para cálculo da concentração de eugenol foi preparada uma solução padrão de eugenol (Sigma) em concentrações de 2; 2,5; 3,0; 5,0 e 10 µg/mL.

3.7 Análises microbiológicas do salame

A determinação de *Salmonella* e *S. aureus* na massa do salame antes da inoculação com os patógenos foi feita seguindo-se a metodologia recomendada pela Portaria n°100 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária de 10.08.1993 (BRASIL, 1993).

O efeito do cravo sobre *Salmonella* e *S. aureus* foi acompanhado durante a fermentação e maturação do embutido fermentado seco. Foram coletadas amostras nos dias: 0 (processamento), 5, 10, 15 e 20 após o processamento.

As análises microbiológicas foram realizadas no Departamento de Microbiologia/DMB da UFV, nas amostras de embutidos produzidos nas quatro repetições do experimento. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para a determinação de *Salmonella*, foram pesadas 50 gramas da amostra e maceradas em “Stomacher” em 450 mL de caldo lactosado. Aliquotas das diluições sucessivas foram plaqueadas em superfície em ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato - XLD (Merck) e ágar Verde Brilhante Vermelho-Fenol Lactose e Sacarose – BPLS (Merck) adicionados de 0,4% de novobiocina (Sigma), seguindo-se incubação a 37°C por 24 horas. Nos tempos de amostragem correspondentes ao 5°,10° e 20° dias de processamento, a contagem de *Salmonella* foi feita também em ágar Rambach (Merck).

Nas amostras correspondentes ao 15° e 20° dia de maturação a determinação de *Salmonella* foi feita pela técnica do Número Mais Provável descrita por D'AOUST (1985), com modificações. Como meio de pré-enriquecimento, preparou-se um homogenato de 50 g do embutido com caldo lactosado e volumes em triplicata de 100, 10, 1, 0,1; 0,01 e 0,001 mL do homogenato foram em caldo lactosado. Esses volumes utilizados corresponderam a 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 e 0,0001 g do produto respectivamente. O meio Rappaport-Vassiliadis (Merck) foi usado como caldo de enriquecimento seletivo, com incubação a 42°C. O plaqueamento em superfície de ágar XLD e ágar BPLS adicionados de 0,4% de novobiocina (Sigma) foi feito para a detecção de colônias típicas. Além da análise por NMP, a presença de *Salmonella* nas amostras de embutidos coletadas no 20° dia foi pesquisada utilizando-se a técnica de Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) em analisador miniVidas® (biolab-Mérieux). Aliquotas de 1 mL e 0,1 mL do homogenato pré-enriquecido por 18 horas a 37°C foram inoculadas em caldo selenito-cistina e Rappaport-Vassiliadis, respectivamente. A incubação do caldo selenito-cistina foi a 37°C e do caldo Rappaport-Vassiliadis a 42°C. Após 24 horas, as culturas foram submetidas a um tratamento térmico por 15 minutos a 100°C e alíquotas de 500 µL de cada um dos caldos seletivos foram usadas para inocular as barretes apropriadas para a imunoenálise.

Para a contagem de *S. aureus* foram retiradas, assepticamente, amostras de 25 gramas de embutidos, as quais foram maceradas em “Stomacher” com 225 mL de água peptonada a 0,1%, adicionada de Tween 80 a 0,1%, utilizado com surfactante. Diluições sucessivas foram feitas e alíquotas foram plaqueadas em superfície de ágar Baird-Parker, enriquecido com gema de ovo e telurito de potássio, seguindo-se de incubação a 37°C por 48 horas, segundo a técnica descrita por LANCETTE e TATINI (1991). Nas terceira e quarta repetições foi verificada a necessidade da adição de 50 µg de cycloheximida (Sigma) ao ágar Baird-Parker com o objetivo de inibir o crescimento de fungos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração de eugenol no cravo-da-índia

O cravo utilizado neste experimento apresentou uma concentração de eugenol de 32,62 mg/g. Portanto, a adição de 0,2% do condimento na massa do salame tipo italiano resultou na incorporação de 65 µg de eugenol por g de massa do embutido. Optou-se por avaliar esta concentração de cravo baseando-se nos resultados obtidos por SCHEID (2001). Esse autor conduziu análises sensoriais descritivas do salame tipo italiano produzido com concentrações entre 0,1 e 0,6% de cravo e constatou que a adição de 0,1 ou 0,2% desse condimento permitia a manutenção de características sensoriais semelhantes ao do produto controle, fabricado sem a adição de cravo.

4.2 Variação do pH no salame tipo italiano

Uma redução do pH de 5,8 para 4,6 foi constatada no período de fermentação correspondente aos primeiros dias após processamento, nas amostras adicionada ou não de 0,2% de cravo (Figura 1). Verificou-se que a adição de 0,2% de cravo resultou em um produto final com um pH mais baixo e, significativamente diferente ($p < 0,05$) daquele do tratamento controle. Resultados semelhantes foram observados por CARMO (1999) em salames tipo italiano

adicionados de 0,1 e 0,2% de cravo que apresentaram pH final entre 4,7 e 4,9 e significativamente mais baixos, do que nos salames sem cravo. SCHEID (2001) também registrou valores de pH entre 4,8 e 5,0 nos salames tipo italiano formulados com a presença de concentrações de 0 a 0,6% de cravo.

Para RACCACH (1992), uma queda rápida do pH é fundamental para inativação efetiva da microbiota indesejável. Esse declínio observado no estágio de fermentação é devido à metabolização dos açúcares pelas culturas *starter*, cuja presença assegura um menor tempo de fermentação (BACUS e BROWN, 1981; VIGNOLO et al., 1989; MENDONÇA, 1992; PRÖLLER, 1994).

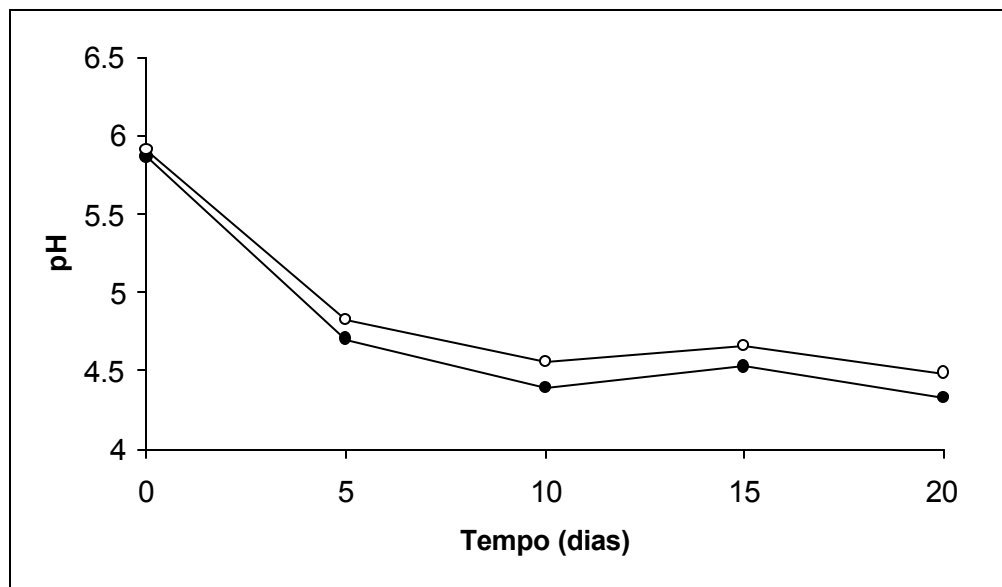


Figura 1 - Variação do pH no salame tipo italiano adicionado de 0,2% de cravo (●) e sem adição de cravo (○).

A menor variação no pH observada ao longo do período de maturação provavelmente se deve à fatores como inibição da microbiota fermentadora pelo próprio ácido produzido, exaustão de carboidratos, abaixamento da temperatura, a_w entre outros. Segundo LÜCKE (1986a), variações no pH podem ocorrer ao longo da maturação e os aumentos observados podem ser atribuídos à produção de aminas e amônia.

4.3 Concentração de ácido láctico no salame tipo italiano

A concentração média de ácido láctico no salame produzido aumentou de 63,64 mmolL⁻¹ (0,59%) no dia do processamento a 254,48 mmolL⁻¹ (2,24%) de ácido láctico ao final do processo de maturação (Figura 2). A concentração inicial de ácido láctico encontrada nos salames antes do processo de fermentação é semelhante àquelas registradas por outros autores. PÉREZ-ALVAREZ et al. (1999) verificaram concentrações de 0,4% de ácido láctico no início do processamento no tempo 0, de salame seco espanhol. FONSECA (1999), produzindo salames adicionados de culturas *starter* ou não, encontrou uma percentagem de ácido láctico em torno de 0,5% no início do processo e de 5% ao final do período de maturação.

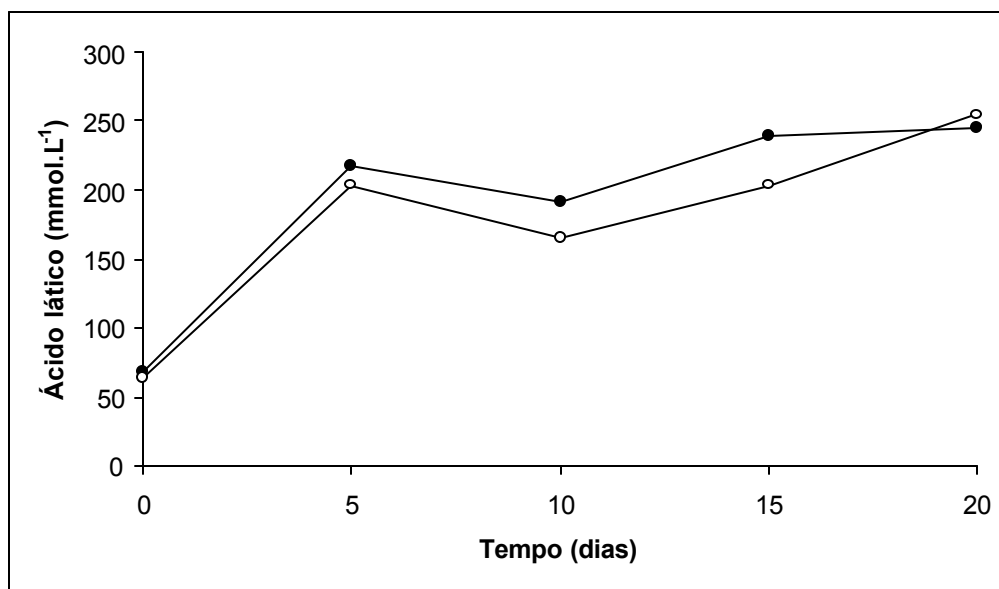


Figura 2 - Concentração de ácido láctico no salame tipo italiano adicionado de 0,2% de cravo (●) e sem adição de cravo (○).

Concentrações finais de ácido láctico mais elevadas também foram observadas por CARMO (1999), com valores de 518,06 mmolL⁻¹ no salame tipo italiano processado sem adição de cravo e de 525,62 e 674,32 mmolL⁻¹ naqueles produzidos com 0,1% e 0,2% de cravo, respectivamente. Esta diferença nas concentrações finais de ácido láctico podem ser atribuídas ao uso de culturas *starter* ativadas e a um período maior de processamento adotado por CARMO (1999).

4.4 Atividade de água no salame tipo italiano

Durante o processamento do salame tipo italiano ocorreu uma redução gradativa da a_w do produto, que variou de 0,96, no início do processo, até 0,91, ao término da maturação (Figura 3), não sendo detectada diferença entre os tratamentos. Os valores de a_w final encontrados nesse estudo estão na faixa para salame citada na literatura consultada, que varia entre 0,79 e 0,92 (HOLLEY et al., 1988; MARCHESINI et al., 1992 e PAPA et al., 1995. SIQUEIRA (1992) constatou valores de a_w variando entre 0,82 a 0,88, quando avaliou três diferentes marcas comerciais de salame tipo italiano produzidos no Brasil. FONSECA (1999) registrou valores de a_w para salame tipo italiano variando de 0,97 no início para cerca de 0,81 a 0,91 ao final do processo. Ao término do processo de maturação do salame tipo italiano, em torno do 28º dia, CARMO (1999) observou uma a_w em torno de 0,85 para os tratamentos com e sem a adição de cravo. Valores de a_w mais baixos para salame fermentado tipo italiano foram encontrados por SCHEID (2001), ao final de 25 dias do processo de fabricação de salames contendo de 0 a 0,6% de cravo, que apresentaram a_w entre 0,77 e 0,83.

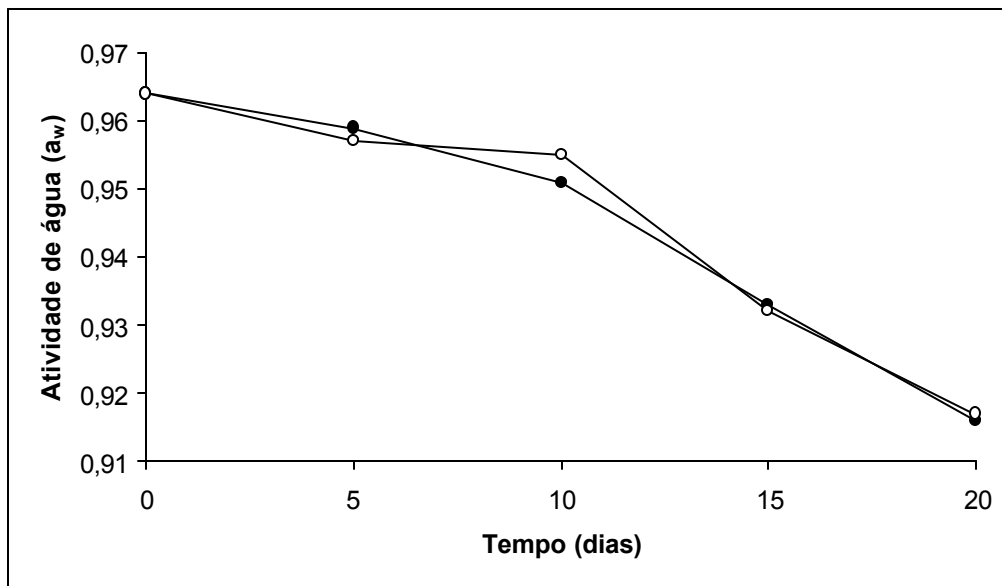


Figura 3 - Variação da a_w no salame tipo italiano adicionado de 0,2% de cravo (●) e sem adição de cravo (○).

4.5 Umidade estimada no salame tipo italiano

A redução gradativa da umidade estimada dos salames resultou em um produto final com, em média, 49,1% de umidade (Figura 4). Segundo LÜCKE (1986b) salames com valores de umidade abaixo de 50% são considerados como secos.

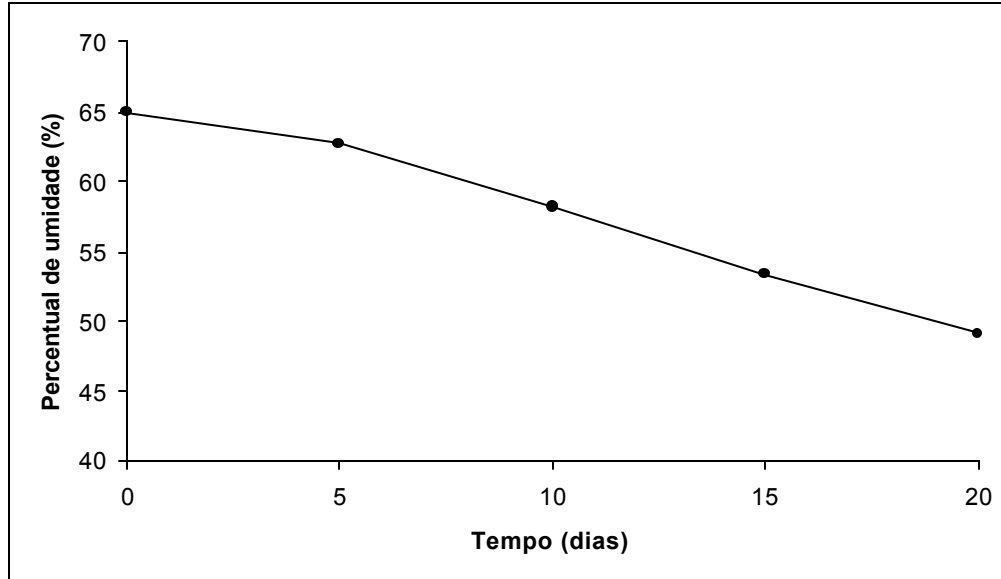


Figura 4 - Variação da umidade estimada no salame tipo italiano, ao longo do período de processamento.

4.5 Efeito de 0,2% de cravo-da-índia sobre *Salmonella* em salame tipo italiano

Nas análises microbiológicas da massa do salame antes da inoculação dos patógenos não foi detectada a presença de *Salmonella*, ressaltando assim a qualidade microbiológica da carne e condimentos utilizados neste estudo.

Foi constatado que, tanto nos salames tipo italiano fabricados com a adição de 0,2% de cravo, como nos salames do tratamento controle, sem cravo, houve um decréscimo no número de células viáveis de *Salmonella* de 1 a 2 ciclos logarítmicos durante o período de fermentação (Figura 5). Esta redução ocorreu, provavelmente, em função do declínio de pH (Figura 1) e da associação de outros fatores presentes no embutido. VALLADARES et al. (1993) demonstraram, pela adição de ácidos orgânicos na massa do salame, a importância da acidificação rápida, já que as temperaturas utilizadas na fase de fermentação são próximas a 25°C, e favorecem a multiplicação de *Salmonella*. Para SMITH e PALUMBO (1981) a produção de ácido pela cultura *starter* com a concomitante redução do

pH em salames fermentados também parece, ser o principal fator responsável pela inativação de *Salmonella*.

O sal e o nitrito adicionados à massa do salame também podem ter contribuído para afetar a viabilidade de *Salmonella*. BACUS (1986) relatou que bactérias Gram-negativas, como *Salmonella* são geralmente inibidas pela adição de mais que 2% de sal e pelo nitrito. A associação da a_w com outras características presentes nos embutidos fermentados foi ressaltada também por outros autores. SILLIKER e GABIS (1986) consideraram que a temperatura de incubação, competição da microbiota e pH combinado com a a_w influenciam no crescimento de *Salmonella*.

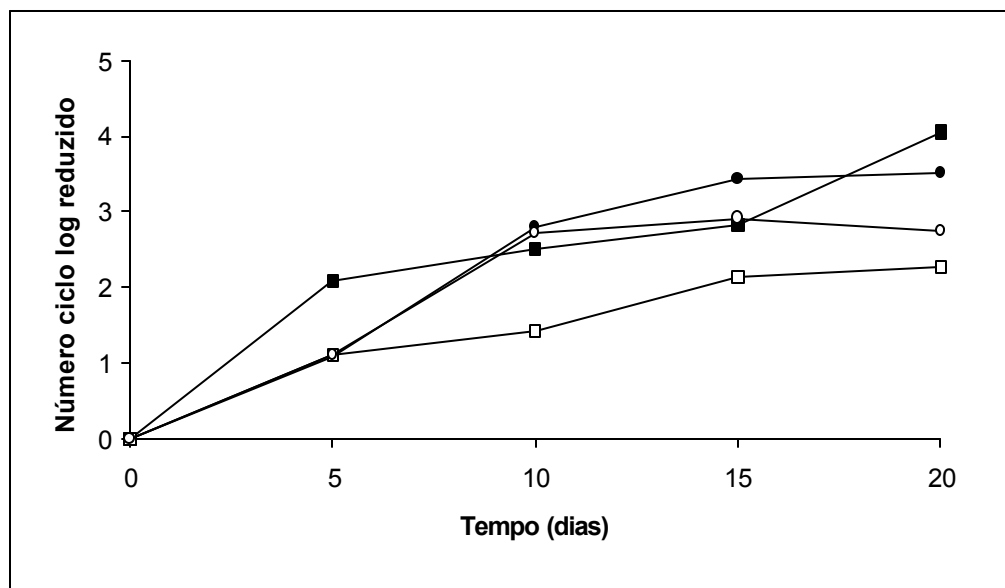


Figura 5 - Número de ciclos logarítmicos reduzidos na contagem de células viáveis de *Salmonella* em salame tipo italiano adicionado de 0,2% de cravo (símbolos fechados) e sem adição de cravo (símbolos abertos) determinado em meio BPLS (■, □) e no meio XLD(●, ○).

O número de ciclos logarítmicos reduzidos na população de *Salmonella* foi significativamente maior ($p < 0,05$) no salame adicionado de 0,2% de cravo, quando utilizou-se o ágar BPLS para a contagem de colônias típicas. Este resultado confirma os dados obtidos por CARMO (1999) que constatou uma redução maior na população de células viáveis de *Listeria innocua* em salames fermentados secos contendo 0,1% e 0,2% de cravo. Embora não tenha sido possível detectar este efeito antimicrobiano do cravo quando se utilizou o ágar XLD, pode-se perceber que a detecção de colônias típicas foi facilitada pela morfologia característica e maior inibição da microbiota contaminante no meio XLD.

A atividade inibitória do cravo ou de seu princípio ativo contra *Salmonella* é registrada na literatura, com resultados contraditórios. KARAPINAR e AKTUG (1987) demonstraram que *Salmonella* foi inibida numa concentração de eugenol de 50 mg/L. Entretanto deve-se ressaltar que essa concentração de eugenol foi determinada em meio de cultura. ARORA e KAUER (1999) avaliaram a eficiência de extratos de alho e de cravo sobre *S. typhi* e verificaram a inibição desse patógeno pelo extrato de alho, mas não pelo extrato de cravo.

Os resultados de contagem de colônias típicas de *Salmonella* em meio seletivo Rambach, utilizado apenas nas amostras correspondentes aos tempos 5, 10 e 20 dias de processamento, foram semelhantes aos encontrados nos meios BPLS e XLD.

A partir do 15º dia de processamento, não foi possível recuperar *Salmonella* por plaqueamento direto e a quantificação do patógeno foi feita por NMP. Ao final do período de 20 dias de processamento do salame tipo italiano não foi possível detectar a presença de *Salmonella* no produto adicionado de 0,2% de cravo, pela técnica do NMP nem por imunoanálises em imunoanalisador miniVidas®. Em apenas uma, das quatro repetições do tratamento controle, sem a adição de cravo, pode ser constatada a presença de *Salmonella* nos embutidos pela técnica de imunoanálise. Os resultados encontrados são semelhantes a outros relatos encontrados na literatura. TURANTAS e ÜNLÜTÜRK (1993)

constatarem uma inibição de *Salmonella* até níveis não detectáveis, inoculada numa população de $2,5 \times 10^5$ UFC/g, após 12 dias de fabricação do salame fermentado Turkish Soudjuk adicionado de cultura *starter*. NISSEN e HOLCK (1998) observaram a inibição de *S. kentuchi* durante a fermentação de um embutido típico norueguês e essa redução foi verificada quando o pH e a a_w também diminuíram, mas a bactéria foi ocasionalmente detectada aos 16 dias do processo de maturação e após 46 dias de estocagem. Smith et al. (1975) citados por SMITH e PALUMBO (1981) demonstraram que em "pepperoni", com uma população inicial de *Salmonella* de 10^4 UFC/g, houve uma ligeira redução na população inicial durante o período de fermentação, quando foi usada cultura *starter*. E, no período de maturação, células viáveis de *Salmonella* não foram encontradas. Redução na população de *S. typhimurium* inoculada em números de $4,4 \times 10^7$ UFC/g em "pepperoni", foi observada por IHNOT et al. (1998), sendo registrado um decréscimo de 1,3 ciclo logarítmico na fase de fermentação a 36°C e de 1,6 ciclo logarítmico na fase de maturação, a 13°C .

4.6 Efeito de 0,2% de cravo-da-índia sobre *Staphylococcus aureus* em salame tipo italiano

Não foi detectada a presença de *S. aureus*, na massa do salame antes da inoculação desse patógeno.

Foi observada uma grande variabilidade entre as repetições dos dados de contagem de colônias de *S. aureus* inoculado na massa do salame tipo italiano. Os resultados médios, entretanto, indicaram uma redução em torno de 0,5 ciclo logarítmico no número de células viáveis ocorrida principalmente, no período de fermentação (Figura 6). Esta menor redução no número de células pode ser atribuída à maior resistência dessa bactéria a fatores como o sal presente nos embutidos fermentados e também à baixa a_w , já que *S. aureus* é capaz de crescer em meios com a_w tão baixos quanto 0,83 (BERGDOLL, 1990).

Não foi verificada diferença significativa no número de UFC/g de *S. aureus* nos embutidos do tratamento com adição de 0,2% de cravo e tratamento controle, sem adição de cravo, em nenhum dos tempos de amostragem. Embora

não tenha sido evidenciada uma atividade antibacteriana do cravo sobre *S. aureus* no salame tipo italiano, existem resultados *in vitro* que confirmam a sensibilidade dessa bactéria ao cravo ou ao seu princípio ativo. Nkanga e Urahi (1981) citados por SHELEF (1983) verificaram que, o crescimento de *S. aureus* foi inibido em homogenato contendo 10% de carne, 1% de cloreto de sódio e 1% de cravo. Quando a concentração de cravo foi aumentada para 10% verificou-se um efeito bactericida. KARAPINAR e AKTUG (1987) demonstraram que *S. aureus* foi inibido na presença de 75 mg/L de eugenol em testes *in vitro*.

Número maior de ciclos logarítmicos reduzidos na população de *S. aureus* foi encontrado por MENDONÇA (1992). Essa autora verificou uma redução de quase dois ciclos logarítmicos na população de *S. aureus* inoculada na massa do salame tipo italiano. Deve-se ressaltar que as culturas *starter* utilizadas não foram as mesmas.

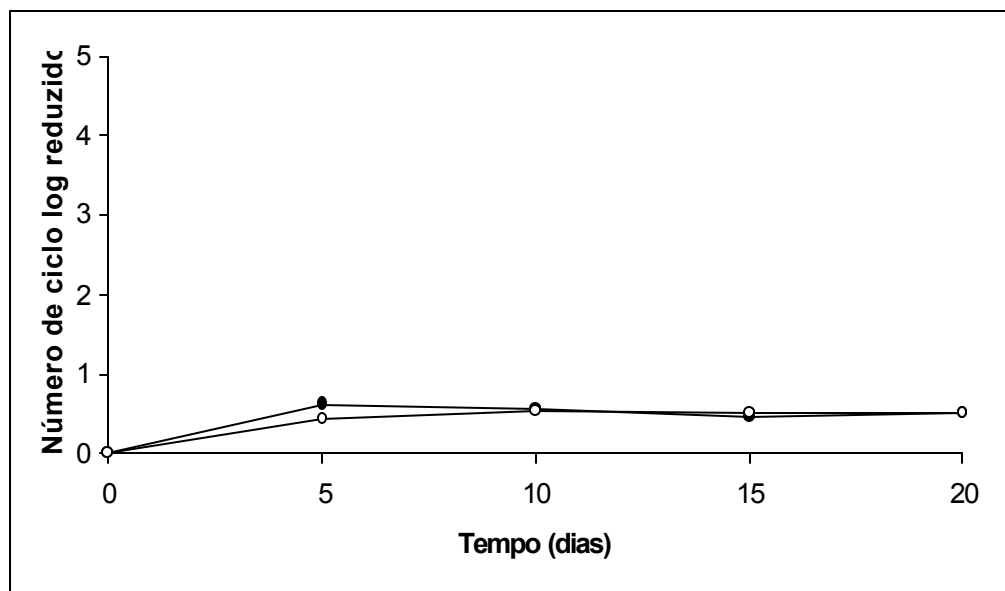


Figura 6 - Número de ciclos logarítmicos reduzidos na contagem de células viáveis de *S. aureus* em salame tipo italiano adicionado de 0,2% de cravo (●) e sem adição de cravo(○).

A maior resistência de *S. aureus* que se estabelecem durante o processamento de embutido fermentado é também registrada por outros autores. HOLLEY et al. (1988) observaram uma queda brusca de pH na fase de fermentação de dois salames tipo italiano seco adicionados de cultura *starter*, mas essa queda não foi suficiente para o controle do crescimento estafilocócico. Entretanto, PETCHSING e WOODBURN (1990), estudando o comportamento de *S. aureus* em embutido de porco fermentado tipo Thai, sem a adição de cultura *starter*, verificaram a multiplicação lenta de *S. aureus* durante a fermentação. Nesse estudo, quando foi adicionado 0,75% de cultura *starter*, *S. aureus* não foi detectado após 48 horas e na presença de 1,5% de cultura *starter*, esse patógeno não foi detectado após 36 horas. A inibição de *S. aureus* em salame fermentado tipo Milano também foi registrada por PAPA et al. (1995) que utilizaram uma concentração de açúcar relativamente baixa e fermentação rápida; porém, adicionaram bactérias lácticas competitivas, que promoveram uma redução rápida de pH. SAMESHIMA et al. (1998) observaram que culturas de *Lactobacillus*, isoladas do trato intestinal de humanos, quando utilizadas como *starter* em salames fermentados, inibiram o crescimento e produção de enterotoxina por *S. aureus* durante a etapa de fermentação em temperaturas de 20° e 30°C.

A manutenção do número de *S. aureus* observada ao longo do processamento (Figura 6), confirma que o pH baixo e as temperaturas baixas ao qual o salame é submetido durante o período de maturação impede o seu crescimento, como observado por INCKE (1998), mas a queda de pH e a a_w reduzida não foram suficientes para a inativação completa de *S. aureus* no salame tipo italiano. Isto demonstra a importância do controle de qualidade da matéria-prima e do processo de elaboração dos salames.

Muitos outros patógenos também são encontrados sobrevivendo em embutidos fermentados (ICMSF, 1996). Embora o pH baixo (entre 4,6 e 5,0) e a atividade de água baixa, entre 0,87 e 0,90 iniba o crescimento de muitas bactérias patogênicas (NISSEN e HOLCK 1998), esses parâmetros podem não ser suficientes para eliminá-las.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Avaliou-se o efeito do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) sobre *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* inoculados em salame tipo italiano na concentração de, aproximadamente, 10^3 a 10^4 UFC/g do produto. O experimento consistiu de um tratamento onde se produziu o embutido adicionado de 0,2% de cravo e de um tratamento controle, sem adição de cravo, ambos adicionados de uma cultura *starter* mista de *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus pentosaceus* (SPX).

A concentração de eugenol no cravo-da-índia foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. Ao se adicionar 0,2% de cravo no embutido, a concentração 32,62 mg/g de eugenol detectada no cravo, ficou em, aproximadamente, 65 µg por grama de massa do embutido.

A concentração de ácido láctico, pH, atividade de água (a_w) e umidade estimada foram avaliadas nas amostras do salame coletadas ao longo do processamento.

O pH final do salame tipo italiano foi, em média, de 4,32 no salame produzido com 0,2% de cravo e de 4,49 no controle, indicando que a adição de cravo resulta em uma maior acidez do produto final. Esse pH mais baixo pode contribuir para uma maior inibição de microrganismos indesejáveis no produto.

A análise de ácido láctico dos embutidos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) evidenciou uma variação de 65,9 mmolL⁻¹, no início do processamento para 249,4 mmolL⁻¹ ao final de 20 dias nos embutidos de ambos os tratamentos, não havendo diferença significativa entre os valores encontrados.

Os salames processados neste estudo resultaram num produto final com a_w de, aproximadamente, 0,91 e um percentual de umidade estimada de 49,1%.

A adição de 0,2% de cravo no salame não resultou em diferenças significativas nas características físico-químicas do produto, com exceção do pH.

Para detecção de *Salmonella*, alíquotas de diluições sucessivas do homogenato foram plaqueadas em ágar seletivo XLD, BPLS e Rambach e, nos tempos de amostragem onde a contagem de *Salmonella* foi menor do que o limite de sensibilidade da técnica, a sua quantificação foi feita pela técnica do Número Mais Provável (NMP). Utilizou-se também, a técnica de detecção por imunoanálise, no período correspondente ao 20º dia de processamento. Foi constatado que, nos salames tipo italiano fabricados com a adição de 0,2% de cravo e naqueles salames do tratamento controle, sem cravo, houve uma redução do número de células viáveis de *Salmonella* que alcançou valores de até quatro ciclos logarítmicos. Quando se usou o ágar BPLS para a contagem de colônias típicas, de *Salmonella*, o número de ciclos logarítmicos reduzidos na população desse patógeno foi, significativamente maior (p<0,05) nos embutidos adicionados de 0,2% de cravo. Entretanto, pode-se perceber, entretanto, que, no meio XLD a detecção das colônias típicas foi facilitada pela morfologia típica das colônias e pela maior inibição da microbiota contaminante. Ao final do período de 20 dias de processamento do salame tipo italiano não foi possível detectar a presença de *Salmonella* no produto adicionado de 0,2% de cravo pela técnica do NMP ou pelo método imunoanalítico. Em apenas uma das quatro repetições do tratamento controle, sem a adição de cravo a presença de *Salmonella* nos embutidos prontos foi constatada, pela técnica de imunoanálise.

A detecção de *S. aureus* foi feita em ágar Baird-Parker, plaqueando-se diluições sucessivas do homogenato. A redução do número de células viáveis de *S. aureus* ocorreu mais acentuadamente, no período de fermentação dos

embutidos de ambos os tratamentos. Embora tenha sido observada uma grande variabilidade na contagem de colônias típicas de *S. aureus* inoculado na massa do salame tipo italiano na fase de fermentação, os resultados indicaram uma redução de meio ciclo logarítmico no número de células viáveis.

Os resultados mostraram que a adição de 0,2% de cravo no salame tipo italiano, nas condições usadas, resultou em efeito inibidor adicional sobre *Salmonella*, mas não sobre *S. aureus* em nenhum dos tempos de amostragem.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRREZÁBAL, M., MATEO, J., DOMÍNGUEZ, C., ZUMALACÁRREGUI, J.M. Spanish paprika and garlic as sources of compounds of technological interest for the production of dry fermented sausages. **Sciences des Aliments**, v. 18, p. 409-414, 1998.
- AL-JALAY, B., BLANK, G., McCONNEL, B., AL-KHAYAT, M. Antioxidant activity of selected spices used in fermented meat sausage. **Journal of Food Protection**, n. 1, v. 50, p. 25-27, 1987.
- ARORA, D.S., KAUER, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 12, p. 257-262, 1999.
- ASPLUND, K., NURMI, E., HIRN, J., HIRVI, T., HILL, P. Survival of *Yersinia enterocolitica* in fermented sausage manufactured with different levels of nitrite and different starter cultures. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 8, p. 710-712, 1993.
- BACUS, J.N. Factors affecting meat fermentation. **Meat Processing**, v. 21, n. 2, p. 50-60, 1982.
- BACUS, J.N. Update: meat fermentation. **Food Technology**, v. 38, n. 6, p. 59-70, 1984.
- BACUS, J.N. Fermented meat and poultry products. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Advances in Meat Research**, v. 2, p. 123-164, 1986.
- BACUS, J.N. Fermented sausage – modern approaches to ancient products. In: PROCESSED MEATS WORKSHOP - RECIPROCAL MEATS

- CONFERENCE, 1993, Lincoln, Nebraska. **Proceedings...** Lincoln, Nebraska: [sn], 1993. Não paginado.
- BACUS, J. Processing procedures to control *Salmonella* and *Escherichia coli* in fermented sausage products. **Food Australia**, v. 49, n.11, p. 543-547, 1997.
- BACUS, J.N., BROWN, W.L. Use of microbial cultures: meat products. **Food Technology**, v. 35, n.1, p. 74-78, 1981.
- BALDINI, P., CANTONI, E., COLLA, F. Dry sausages ripening: influence of thermohygro-metric conditions on microbiological, chemical and physico-chemical characteristics. **Food Research International**, n. 33, p. 161-170, 2000.
- BERGDOLL, M.S. Staphylococcal Food Poisoning. In: CLIVER, D.O. **Foodborne Diseases**. London: Academic Press Limited, 1990, p. 186-204.
- BERWAL, J.S., KUMAR, RAJ. Effect of starter cultures on production of histamine and levels of nitrite in fermented sausages. **Journal Food Science Technology**, v. 35, n. 2, p. 187-190, 1998.
- BORGES, M.F., SIQUEIRA, R.S., BITTENCOURT, A.M., VANETTI, M.C.D., GOMIDE, L.A.M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, n. 30, p.362-364, 1999.
- BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. Effect of proteolytic starter cultures of *Staphylococcus* spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, n. 46, p. 95-104, 1999a.
- BOVER-CID, S., SCHOPPEN, S., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. **Meat Science**, n. 51, p. 305-311, 1999b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria de Defesa Agropecuária. Decreto nº 81.771, 7 jun. 1978. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 156, p. 11943-11959, 17 ago. 1993. Seção 1, pt.
- CAPLICE, E., FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.
- CARMO, C.A.C. **Inibição do crescimento de *Listeria*, por culturas lácticas e condimentos, em salame tipo**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 64p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry-cured salami – Washington and California, 1994. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 44, n. 9, p. 157-160, 1995.

- CHANDER, H., BATISH, V.K., BABU, S., SINGH, R.S. Factors affecting amine production by a selected strain of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 4, p. 940-942, 1989.
- D'AOUST, J.Y. Infective dose of *Salmonella typhimurium* in Cheddar cheese. **American Journal of Epidemiology**. v.122, n. 4, p. 717-720, 1985.
- EEROLA, H.S., SAGUÉS, A.X.R., HIRVI, T.K. Biogenic amines in finnish dry sausages. **Journal of Food Safety**, n. 18, p. 127-138, 1998.
- FARBER, J.M., SANDERS, G.W., JOHNSTON, M.A. A Survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 7, p. 456-458, 1989.
- FISHER, I.U., DENGLER, H.J. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for the determination of eugenol in body fluids. **Journal of Chromatography**. n. 525, p. 369-377, 1990.
- FONSECA, S.H. **Sobrevivência de *Listeria innocua* em salame tipo italiano**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)– Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- GALLI, F. Os Embutidos – como fabricá-los. **Revista Nacional da Carne**, p.16-27, 1993.
- GLASS, K.A., LOEFFELHOLZ, J.M., FORD, J.P., DOYLE, M.P. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as effected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. **Applied Environment Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2513-2516, 1992.
- HAO, Y.Y., BRACKETT, R.E., DOYLE, M.P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated, cooked poultry. **Food Microbiology**, n. 15, p. 367-378, 1998.
- HOLLEY, R.A., LAMMERDING, A.M., TITTIGER, F. Microbial safety of traditional and starter-mediated processes for the manufacture of italian dry sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 1, p.49-62, 1988.
- IHNOT, A.M., ROERING, A.M., WIERZBA, R.K., FAITH, N.G, LUCHANSKY, J.B. Behavior of *Salmonella typhimurium* DT 104 during the manufacture and storage of pepperoni. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, p.117-1221, 1998.
- INCZE, K. Dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 49, n. Suppl. I, p. 169-177, 1998.
- INTERNATIONAL COMMISION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods**. Aspen: Publishers, Inc. Gaithersburg, 2000. p. 615. (Microbial ecology of food commodities, 6).

- JOHANSSON, G., BERDAGUÉ, J.L., LARSSON, N.T., BORCH, E. Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. **Meat Science**, v. 28, p. 203-218, 1994.
- JUDGE, M.D., ABERLE, E.D., FORREST, J.C. HEDRICK, H.B., MERKEL, R.A. **Principles of Meat Science**. Kendal Hunt Publishing Company. 2 ed. 1989. 351 p.
- KARAPINAR, M., AKTUG, S.E. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, menthol and anethole. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 161-166, 1987.
- KIM, J., MARSHALL, M.R., WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 43, p. 2839-2845, 1995.
- LANCETTE, G.A., TATINI, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: 1991.p. 533-550.
- LIANO, D.G., CUESTA, P., RODRÍGUEZ, A. Biogenic amine production by wild lactococcal and leuconostoc strains. **Letters in Applied Microbiology**, n. 26, p. 270-274, 1998.
- LIZASO, G., CHASCO, J., BERIAIN, M. J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**, v. 16, p. 219-228, 1999.
- LONERGAN, S., MANDIGO, R. Fermented meat sausages. In: PROCESSED MEAT WORKSHOP - RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 1993, Lincoln, Nebraska. **Proceedings...** Lincoln, Nebraska: [sn], 1993. Não paginado.
- LÜCKE, F-K. Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw ham. **Fleischwirtsch**, v. 66, n. 10, p. 1505-1509, 1986a.
- LÜCKE, F-K. Fermented sausages. In: MICROBIOLOGY OF FERMENTED FOODS. Londres: B.J.B, v.2, p. 41-83, 1986b.
- MARCHESINI, B., BRUTTIN, A., ROMAILLER, N., MORETON, R. S., STUCCHI, C., SOZZI, T. Microbiological events during commercial meat fermentations. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 3, p. 203-209, 1992.
- MARCY, J.A., KRAFT, A.A., OLSON, D.G., HOTCHKISS, D.K. Fate of *Staphylococcus aureus* in reduced sodium fermented sausage. **Journal of Food Science**, v. 50, p. 316-320, 1985.
- MARES, A., NEYTS, K., DEBEVERE, J. Influence of pH, salt and nitrite on the heme-dependent catalase activity of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, n. 24, p. 191-198, 1994.

- MASTERS, B.A., OBLINGER, J.L., GOODFELLOW, S.J., BACUS, J.N., BROWN, W.L. Fate of *Salmonella-newport* and *Salmonella-typhimurium* inoculated into summer sausage. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 7, p. 527-530, 1981.
- MENDONÇA, R.C.S. Aislamiento, selección y caracterización de levaduras de embutidos com vistas a su utilización como coadyuvante en el processo de curado. Valencia, Universidade de Valencia, 2000. 188p. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) –
- MENDONÇA, R.C.S. *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* na **produção de salame italiano**. Viçosa, MG: UFV, 1992. 112p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- METAXOPOULOS, J., GENIGEORGIS, C., FANELLI, M.J., COSMA E. Production of italian dry salami : Initiation of Staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 5, p. 347-352, 1981.
- MONTEL, M.C., TALON, R., BERDAGUÉ, J.L., CANTONNET. Effects of starter cultures on the biochemical characteristics of french dry sausages. **Meat Science**, n. 35, p. 229-240, 1993.
- NISSEN, H., HOLCK, A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucki* in Norwegian fermented, dry sausage. **Food Microbiology**, v. 15, p. 273-279, 1998.
- ORDÓNEZ, J. A, HIERRO, E. M., BRUNA, J. M. HOZ, L. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, p. 329-367, 1999.
- PANDIT, V.A., SHELEF, L.A. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.). **Food Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 57-63, 1994.
- PAPA, F., ZAMBONELLI, C., GRAZIA, L. Production of Milano style salami of good quality and safety. **Food Microbiology**, n. 12, p. 9-12, 1995.
- PATON, A.W, RATCLIFF, R.M., DOYLE, R.M, MURRAY, J.S., DAVOS D., LANSER, J.A., PATON, J.C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1622-1627, 1996.

- PÉREZ-ALVAREZ, J.A., SAYAS-BARBERÁ, M.E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., ARANDA-CATALÁ, V. Physicochemical characteristics of spanish-type dry-cured sausage. **Food Research International**, n. 32, p. 599-607, 1999.
- PETCHSING, U., WOODBURN, M. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nham (Thai-style fermented pork sausage). **International Journal of Food Microbiology**, n. 10, p.183-192, 1990.
- PIVNIC, H. Sales del curado y substancias análogas. In: INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecología microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980. p. 143-167. (Microorganismos de los Alimentos 3).
- PROCHASKA, J.F., RICKE, S.C., KEETON, J.T. Meat fermentation – Research Opportunities. **Food Technology**, v. 52, n. 9, p. 52-56, 1998.
- PRÖLLER, T. Tailor-made cultures for fast and safe production of fermented, dry sausages. **Die Fleischerei**, v.10, p.10-16, 1994.
- RACCACH, M. Some aspects of meat fermentation. **Food Microbiology**, p. 55-65, 1992.
- SAGUÉS, A.X.R., HERRERO, M.M.H., JEREZ, J.J.R., FERNÁNDEZ, E.J.Q., VENTURA, M.T.M. Aminas biogénas en queso: riesgo toxicológico y factores que influyen en su formación. **Alimentaria**, n. 294, p. 59-66, 1998.
- SAMESHIMA, T., MAGOME, C., TAKESHITA, K., ARIHARA, K., ITOH, M., KONDO, Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, n. 41, p. 1-7, 1998.
- SCHEID, G.A. **Avaliação sensorial e físico-química de salame tipo italiano com diferentes concentrações de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllus*)**. Viçosa, MG: UFV, 2001. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.
- SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, n. 6, p. 29-44, 1983.
- SILLIKER, J.N., GABIS, D. *Salmonella*. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Advances in Meat Research**, v. 2, p. 209-226, 1986.
- SIQUEIRA, R.S. **Comportamento de *Yersinia enterocolitica* sob condições de processamento de salame tipo italiano e em presença de *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus***. Viçosa, MG: UFV, 1992. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, 1992.

- SMITH, J.L., PALUMBO, S.A. Microorganisms as food additives. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 12, p. 936-955, 1981.
- SMITH, J.L., PALUMBO, S.A. Use of starter cultures in meats. **Journal of Food Protection**, v. 46, n. 11, p. 997-1006, 1983.
- TERRA, N.N. Princípios de fermentação de produtos cárneos: Culturas “starter”. **Revista Nacional da Carne**, n. 191, p. 35-37, 1993a.
- TERRA, N.N. Princípios de fermentação de produtos cárneos: Culturas “starter” (final). **Revista Nacional da Carne**, n. 192, p. 24-27, 1993b.
- TRISTÃO, I.H. **Bactérias isoladas de salame tipo Italiano e sua resistência a antibióticos e a bactérias lácticas**. Viçosa, MG: UFV, 1998. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- TURANTAS, F., ÜNLÜTÜRK, A. The effect of nitrite, garlic and starter culture on the survival of *Salmonella typhimurium* in Turkish Soudjuk. **Journal Science Food Agriculture**, n. 61, p. 95-99, 1993.
- UPTON, M. Relationships between pathogen growth and the general microbiota on raw and processed meat and poultry. **Journal of Food Safety**, v. 15, p. 133-144, 1995.
- VALLADARES, C., ROCA, M., RAMOS, M., et al. Efecto del proceso tecnologico sobre la Salmonella en productos crudos fermentados. **Alimentaria**, v.30, n 245, p. 33-35, 1993.
- VIGNOLO G.M., RUIZ HOLGADO A.P., OLIVER G. Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 11, p. 787-791, 1989.
- WENDAHOON, C.N., SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 3, p. 280-283, 1995.
- ZAIKA, L.L., KISSINGER, J.C. Effects of some spices on acid production by starter cultures. **Journal of Food Protection**, v. 42, n. 7, p. 572-576, 1979.
- ZAIKA, L.L., KISSINGER, J.C. Fermentation enhancement by spices: Identification of active component. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 1, p. 5-9, 1984.
- ZAIKA, L.L., ZELL, T.E., PALUMBO, S.A., SMITH, J.L. Effect of spices and salt on fermentation of lebanon Bologna-type sausage. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 186-189, 1978.