

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

USO DE ULTRASSOM NA PRODUÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO

TESE DE DOUTORADO

Larissa de Lima Alves

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Larissa de Lima Alves

USO DE ULTRASSOM NA PRODUÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Cichoski

Co-orientador: Prof. Dr. Juliano Smanioto Barin

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Lima Alves, Larissa
Uso de ultrassom na produção de salame tipo Italiano /
Larissa de Lima Alves.-2016.
179 p.; 30cm

Orientador: Alexandre José Cichoski
Coorientador: Juliano Smanioto Barin
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

1. Tecnologia emergente 2. Tecnologia de carnes e
derivados 3. Ciência da carne 4. Tecnologia de alimentos
5. Embutido fermentado I. Cichoski, Alexandre José II.
Smanioto Barin, Juliano III. Título.

Larissa de Lima Alves

USO DE ULTRASSOM NA PRODUÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de Concentração Ciência e Tecnologia de Alimentos, como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos**.

Aprovado em 19 de maio de 2016:

Alexandre José Cichoski, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Juliano Smanioto Barin, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)

Carla da Silveira Frank, Dra. (IFFarroupilha)

Cezar Augusto Bizzi, Dr. (UFSM)

Jean Carlos Brustolin, Dr.

Roger Wagner, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

*Ao meu pai, Pedro Genaro Alves (in memorian), que está vendo a filha se tornar “Doutora”
a partir de outro plano. Sei que esteve comigo nesta caminhada.
E como não poderia deixar de ser, este trabalho também é dedicado à minha pequena Tainá
Alves Quartiéri Monteiro (in memorian), que se encontra junto aos anjos, assim como ela foi
e é um na minha vida...*

AGRADECIMENTOS

Com certeza a concretização de uma tese não se faz com um par de mãos apenas. A realização deste trabalho se deu com o auxílio e a compreensão de muitas pessoas. Agradeço especialmente:

- à Deus pelo apoio nos momentos que precisei ao longo da realização deste trabalho;
- à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realizar toda minha formação profissional em uma instituição tão bem conceituada;
- ao meu orientador neste trabalho, Prof. Alexandre José Cichoski, pela orientação, confiança, disponibilidade, paciência, dedicação e principalmente por tantos conhecimentos a mim repassados;
- ao meu co-orientador, Prof. Juliano Smanioto Barin, pela co-orientação, por ter atendido minhas dúvidas e por ter colaborado diretamente neste trabalho;
- ao professor Roger Wagner e sua equipe pelo imenso auxílio em algumas análises;
- ao professor Renius Mello por ter me auxiliado com a análise estatística de tantos dados;
- aos membros da banca da qualificação e defesa da tese, pela disponibilidade e contribuições;
- às professoras que fizeram com que eu me apaixonasse pela pesquisa desde a graduação e pelas quais tenho imensa admiração, Tatiana Emanuelli e Leila Picolli;
- aos professores Érico Flores e César Bizzi e ao Matheus Gonçalves, do CEPETRO, pelo auxílio com os banhos de ultrassom e tantas dúvidas sanadas;
- ao Instituto Federal Farroupilha – Campus Panambi, pelo apoio e incentivo na realização desta qualificação profissional;
- ao CNPq, FAPERGS e UFSM pelo apoio financeiro;
- a tantos doutorandos, mestrandos e ICs do NTA que me ajudaram ao longo destes quatro anos... Agradeço especialmente a Amanda Ruviano, Dirceu Athayde, Diego Flores, Vanessa Batista, Andriéli Borges, Suelem Lima, Débora Brum, Cristine Rampelotto, Bruna

Tisher, Bruna Klein, Mariane Bittencourt e Jossie Donadel. Sem a ajuda de vocês este trabalho não existiria.

- à minha querida “IC” Marianna Stefanello, que esteve do meu lado ajudando nas minhas análises e com quem sempre pude contar. Obrigada por sua amizade e dedicação;

- a todos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM que colaboraram direta e indiretamente com este trabalho;

- à minha amiga Lara Becker pela amizade, apoio e por ter me oferecido sua casa nestes quatro anos em Santa Maria, para que eu pudesse descansar;

- à minha mãe, Neiva de Lima Alves, minha maior incentivadora, pelo modelo de dedicação profissional, apoio, força e por ser minha mãe na plenitude que isto representa. Ao meu pai, Pedro Genaro Alves (*in memoriam*), que mesmo de longe sempre esteve comigo. Ao meu irmão, Pedro Genaro Alves Filho, simplesmente por ser o melhor irmão que eu podia ter e por sempre ter me apoiado nesta caminhada;

- ao meu esposo, Taigor Quartieri Monteiro, por me apoiar incondicionalmente e por ter compreendido minhas ausências para concretização deste trabalho. Obrigada pelo amor, paciência, dedicação e incentivo desde sempre. Agradeço também à sua família e ao Thierry Monteiro, meu enteado mimoso e esperto que compreendeu tão bem minhas ausências mesmo sendo uma criança;

- à minha pequena Tainá (*in memoriam*), pedaço de mim que iluminou meus dias por poucos meses, mas que me ensinou o que é amor infinito e incondicional. Boa parte da força que precisei para suportar sua partida foi amparada na escrita desta tese.

“Continue a nadar, continue a nadar...”

*(Trecho do filme “Procurando Nemo” – Pixar
Animation Studio e Walt Disney Pictures,
2003)*

RESUMO

USO DE ULTRASSOM NA PRODUÇÃO DE SALAME TIPO ITALIANO

AUTORA: Larissa de Lima Alves
ORIENTADOR: Alexandre José Cichoski
CO-ORIENTADOR: Juliano Smanioto Barin

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de banho de ultrassom (US, 25 kHz, 500 W) sobre características físicas, químicas e microbiológicas de salame tipo Italiano durante seu processamento e no armazenamento. O US foi usado logo após embutimento da massa na tripa durante diferentes tempos de exposição (0 min – controle não sonicado, 3 min, 6 min e 9 min). Foi adotado delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os dados submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) para testar a significância das variáveis. Posteriormente foi feita análise de correlação de Pearson e as diferenças entre as médias calculadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Alguns dados foram sujeitos à análise de variância multivariada (MANOVA), complementada pela técnica de componentes principais. As avaliações realizadas incluíram contagens das bactérias lácticas (*Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici*) e *Micrococcaceae* (*Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus carnosus*), a_w , pH, cor (CIE $L^*a^*b^*$), oxidação lipídica (índice de peróxidos e TBARS), oxidação proteica (tiol), pigmentos heme totais, ferro não heme e metamioglobina durante o processamento (dias 0, 2, 15 e 28) e ao longo da vida de prateleira (após 1, 30 e 120 dias). Parâmetros de textura (coesividade, flexibilidade, mastigabilidade e dureza) foram avaliados nos salames após 90 dias de armazenamento e a formação de compostos voláteis no início (1º dia) e fim do armazenamento (120º dia). O US exerceu efeito positivo no crescimento das bactérias em algumas etapas do processamento e do armazenamento ($p < 0,05$), principalmente sobre *Micrococcaceae* (*Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus carnosus*) e com 9 min de exposição. O pH, a_w e parâmetros de cor não foram afetados de maneira significativa pelo US ($p > 0,05$). A oxidação de lipídios e de proteínas foi acelerada com o US, contudo mantendo valores aceitáveis. Os pigmentos heme totais, ferro não heme e metamioglobina foram afetados pela sonicação ($p < 0,05$) e influenciaram nas reações oxidativas. A análise discriminatória canônica no processamento e no armazenamento separou as amostras em grupos de acordo com o dia de análise e não de acordo com os tratamentos, tanto em função do efeito preponderante do tempo de processamento/armazenamento nas características do salame quanto por falta de efeito expressivo do tempo de sonicação. O US não afetou significativamente parâmetros do perfil de textura ($p > 0,05$), contudo dureza e mastigabilidade mostraram tendência a reduzirem com a sonicação. Com relação aos compostos voláteis, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p > 0,05$), com exceção de etanol e hexanol ($p < 0,05$) no início do armazenamento. O US afetou a curva de crescimento das bactérias, acelerando ou inibindo seu crescimento em alguns pontos, e apresenta potencial a ser explorado na melhora da textura e na formação de cor vermelha do salame. A falta de efeito pronunciado do US sobre algumas características foi atribuída principalmente aos parâmetros acústicos adotados, baixo tempo de exposição ao US, consistência do salame, heterogeneidade da massa e quantidade/composição da gordura, entre outros fatores. Com isso, sugere-se a realização de mais estudos que avaliem as potencialidades do uso do US como tecnologia emergente na fabricação de salame.

Palavras-chave: tecnologia emergente, sonicação, bactérias lácticas, *Micrococcaceae*, embutido fermentado.

ABSTRACT

USE OF ULTRASOUND ON ITALIAN-TYPE FERMENTED SAUSAGE MANUFACTURATION

AUTHOR: Larissa de Lima Alves
ADVISOR: Alexandre José Cichoski
CO-ADVISOR: Juliano Smanioto Barin

The aim of this study was to evaluate the effect of ultrasound application (US, bath 25 kHz, 500 W) on physical, chemical and microbiological properties of Italian-type fermented sausage during processing and storage. The US was used after mass stuffing in synthetic packaging during 0 min, 3 min, 6 min and 9 min of application. Completely randomized design was adopted (DIC) and the data submitted to analysis of variance (ANOVA) to test the significance of the variables. Further, a Pearson's correlation analysis was performed and the differences among the averages were calculated by using the Tukey's test ($p \leq 0.05$). Some data were subjected to multivariate analysis of variance (MANOVA), complemented by the technique of principal components analysis. The parameters of fermented sausage evaluated included counts of lactic acid bacteria (*Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici*) and *Micrococcaceae* (*Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*), aw, pH, color (CIE L * a * b *), lipid oxidation (peroxide value and TBARS), protein oxidation (thiol), total heme pigments, non-heme iron and metmyoglobin, during processing (days 0, 2, 15 and 28) and along the shelf-life (after 1, 30 and 120 days). Texture parameters (cohesiveness, flexibility, chewiness and hardness) were evaluated in fermented sausages after 90 days of storage and the formation of volatile compounds at the beginning (day 1) and the end of storage (after 120 days). US had a positive effect on the growth of bacteria in some processing steps and storage conditions ($p < 0.05$), especially on *Micrococcaceae* (*Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*) with 9 min of US exposure. The pH, aw and color parameters were not significantly affected by the US ($p > 0.05$). The oxidation of lipids and proteins was accelerated with US application, but maintaining acceptable values in the final product. The total heme pigments, non-heme iron and metmyoglobin were affected by sonication ($p < 0.05$) and influenced the oxidative reactions and vice versa. The canonical discriminant analysis separated the samples into groups according to the day of evaluation and not according to the treatments. Therefore, due to the predominant effect of processing time / storage in fermented sausage characteristics a lack of significant effect of sonication time was observed. The US did not significantly affect texture profile parameters ($p > 0.05$), but hardness and chewiness tended to reduce with sonication. Regarding the volatiles were no statistical differences between treatments ($p > 0.05$), except for ethanol and hexanol ($p < 0.05$) at the beginning of storage. The US has affected the growth curve of bacteria, accelerating or inhibiting their growth that some points, and has the potential to be explored in improving the texture and red color formation of fermented sausages. The lack of pronounced effect on US some characteristics was primarily attributable to acoustic parameters adopted, low exposure time to the US, fermented sausage consistency, mass heterogeneity and quantity / fat composition, among other factors. Thus, it is suggested to further studies to assess the potential of using the US as emerging technology in the fermented sausage manufacturing.

Keywords: emerging technology, sonication, lactic bacteria, *Micrococcaceae*, fermented sausage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Espectro do som.....	20
Figura 2 – Aparatos de US.....	21
Figura 3 – Fenômeno de cavitação acústica.....	21

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1 – Salame envasado em embalagem plástica para ser submetido a sonicação.....	30
Figura 2 – Sonicação dos salames	31
Figura 3 – Salames durante permanência na câmara de fermentação e maturação.....	33

MANUSCRITO 1

Figura 1 – Viabilidade de micro-organismos em salame tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e armazenamento (1, 30 e 120 dias)	68
Figura 2 – Comportamento de pH de salames tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias)	69
Figura 3 – Oxidação lipídica de salames tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e armazenamento (1, 30 e 120 dias).....	70
Figura 4 – Concentração de tiol (nanomol tiol mg proteína ⁻¹) de salames tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias)	71
Figura 5 – Teor de pigmentos heme totais (PHT) de salames expostos ao ultrassom por 0 min (controle não sonicado), 3 min, 6 min ou 9 min nas etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias)	72
Figura 6 – Concentração de ferro não heme (mg g ⁻¹) em salames tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias).....	73

Figura 7 – Teor de metamioglobina (%) em salames tipo Italiano expostos ao ultrassom por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias)	74
Figura 8 – Análise Discriminatória Canônica.....	75

LISTA DE TABELAS**MANUSCRITO 1**

Tabela 1 – Perfil de textura de salames tipo Italiano sonicados em banho US 25 kHz por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min.....	67
---	----

MANUSCRITO 2

Tabela 1 – Área ($\times 10^6$) dos compostos voláteis de salames tipo Italiano submetidos ao banho de US 25 kHz no processamento – 1º dia de armazenamento	92
Tabela 2 – Área ($\times 10^6$) dos compostos voláteis de salames tipo Italiano submetidos ao banho de US 25 kHz no processamento – 120º dia de armazenamento	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
Atm	Atmosfera (medida de pressão)
Aw	Atividade de água
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DTCA	Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (UFSM)
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-ácido nitrobenzoico)
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
Fe	Ferro
FeNH	Ferro não heme
g	Gramas(s)
GC-MS	Cromatógrafo Gasoso com Espectrômetro de Massas
GLM	General Linear Model
Hb	Hemoglobina
Hz	Hertz
J	Joule
K	Kelvin
kg	Quilograma
kHz	Quilohertz
m ²	Metro quadrado
MANOVA	Análise Multivariada de Variância
Mb	Mioglobina
MDA	Malonaldeído
mEq kg ⁻¹	Miliequivalentes/kilograma
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
MMb	Metamioglobina
mL	Mililitros
N	Newtons
NOMb	Nitrosomioglobina
nmol	Nanomol
O ₂	Oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
PHT	Pigmentos Heme Totais
PPGCTA	Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
<i>t_a</i>	Tempo de armazenamento
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<i>t_p</i>	Tempo de processamento
TPA	Análise de perfil de textura
TPO ₂	Taxa de permeabilidade ao oxigênio
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UR	Umidade Relativa
US	Ultrassom
VP	Valor de peróxidos
UFC	Unidade formadora de colônias
W	Watts
WBS-force	Warner-Bratzler Shear force

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO E PROPOSIÇÃO	17
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS	28
2 MANUSCRITO 1 - Implicações do Uso de Ultrassom sobre Características Físicas, Químicas, Microbiológicas e Textura de Salame Tipo Italiano	35
3 MANUSCRITO 2 - Compostos voláteis de salames tipo Italiano submetidos ao ultrassom no processamento.....	77
4 DISCUSSÃO GERAL	95
5 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE A – EXPERIMENTOS PRELIMINARES.....	106
APÊNDICE B - ARTIGO 1: O ultrassom no amaciamento de carnes.....	111
APÊNDICE C – ARTIGO 2: Effect of ultrasound treatment (bath and probe systems) on physical, chemical and microbiological properties of <i>Semítendinosus</i> beef during storage	119
APÊNDICE D – EXEMPLO DE CROMATOGRAMA OBTIDO NA ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS	149
ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO PERIÓDICO FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY	151
ANEXO B – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO PERIÓDICO FOOD RESEARCH INTERNATIONAL	165

1 APRESENTAÇÃO E PROPOSIÇÃO

A tecnologia de alimentos visa desenvolver produtos com maior estabilidade na vida de prateleira e que ao mesmo tempo sejam seguros e com alta qualidade nutricional e sensorial. O aumento na demanda de alimentos em termos de quantidade e qualidade, aliado a conceitos atuais de sustentabilidade, impõem modificações nas técnicas de processamento. Este cenário abre espaço para as chamadas tecnologias emergentes, fundamentadas na redução do gasto de energia, recursos naturais, tempo de processamento e custos (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; BERMÚDEZ-AGUIRRE; MOBBS; BARBOSA-CÁNOVAS, 2011; CHANDRAPALA et al., 2012). Dentre estas, temos o ultrassom (US), explorado em diferentes alimentos (DOLATOWSKI et al., 2007; LEADLEY; WILLIAMS, 2008; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; CÁRCEL et al., 2012; CHANDRAPALA et al., 2012; SIKES et al., 2014).

Na linha de carnes, a maioria dos trabalhos se concentram em avaliar o efeito do US sobre maciez da carne *in natura* (GOT et al., 1999; STADNIK; DOLATOWSKI, 2011; JAYASOORIYA et al., 2012, ALVES et al., 2013), restando lacunas a respeito de como esta tecnologia pode ser explorada em derivados cárneos. Pesquisas em matrizes alimentares apontam a possibilidade do US influenciar no crescimento de alguns micro-organismos e no processo fermentativo (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009, 2012; YEO; LIONG, 2011; KWIATKOWSKA et al., 2011; CICHOSKI et al., 2015). No entanto, ainda são incipientes os dados sobre o efeito do US na viabilidade de micro-organismos usados na fabricação de produtos cárneos fermentados e como a tecnologia pode afetar o processo fermentativo e demais características do produto. Ainda, é pouco avaliado como o US pode influenciar na estabilidade deste tipo de produto ao longo do tempo, uma vez que os produtos fermentados não são submetidos ao cozimento.

Sendo assim, surge a oportunidade de avaliar o efeito do uso do US em produto cárneo fermentado. O salame tipo Italiano foi escolhido para estudo devido à diversidade de reações bioquímicas e modificações físicas e químicas envolvidas na etapa de processamento (fermentação e início da maturação) e no armazenamento (maturação), aliado à importância comercial e a boa aceitação sensorial do produto em nosso país, especialmente em nossa região.

O salame possui características interessantes para serem estudadas quando uma nova tecnologia é adotada em seu processamento, sendo que algumas já mostraram ser passíveis da influência do US em outros alimentos. O uso de cultura de micro-organismos *starter*, o processo fermentativo, a desidratação sofrida ao longo do tempo, a elevada atividade enzimática, o alto conteúdo de gordura e a longa vida de prateleira são algumas destas características. Atributos de qualidade importantes para este produto como cor, aroma e a textura podem ser afetados pelo US e necessitam ser avaliados.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do uso de US sobre características do salame tipo Italiano durante as etapas de produção e ao longo do armazenamento. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito de diferentes combinações de parâmetros acústicos do US (frequência, intensidade, potência) sobre a viabilidade das culturas puras (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus xylosum* e *Staphylococcus carnosus*) durante as etapas de produção e de armazenamento do salame, assim como no processo fermentativo;
- Analisar as implicações do US sobre as características físico-químicas e nas reações oxidativas de lipídios e de proteínas;
- Verificar efeito do US nos parâmetros de textura nas fatias de salame;
- Avaliar o efeito do US na formação de compostos voláteis do salame durante o armazenamento;
- Avaliar a potencialidade do US ser uma tecnologia emergente usada na indústria de processamento de salame tipo Italiano.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Tecnologias emergentes e ultrassom

Na tecnologia de alimentos, as técnicas convencionais de processamento e extração vêm sendo substituídas pelas chamadas tecnologias emergentes, que tipicamente envolvem menos tempo de processamento, menor gasto de água e de energia, além de menor produção de efluentes e substâncias tóxicas (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). Dentre as novas tecnologias, destacam-se a extração por fluido supercrítico, as micro-ondas, a radiação ultra-violeta, o aquecimento ôhmico, o campo magnético, a alta pressão hidrostática e o ultrassom (LEADLEY; WILLIAMS, 2008; BERMÚDEZ-AGUIRRE; MOBBS; BARBOSA-CÁNOVAS, 2011).

O ultrassom (US) tem sido explorado desde sua descoberta no começo do século XX para diversos fins na medicina e na indústria química e de engenharia. Com os avanços nos estudos dessa tecnologia e o entendimento de seus mecanismos de ação, surgiu a possibilidade de utilização na área de alimentos. Desde a metade do século passado, o US vem sendo estudado no processamento, na preservação e extração de diversas substâncias em alimentos. Estudos têm mostrado sua eficiência nos processos de cozimento, congelamento/descongelamento, cristalização, emulsificação, filtração, moldagem, corte, extração, secagem, desgaseificação, oxidação e maturação em diferentes matrizes alimentares (DOLATOWSKI et al., 2007; LEADLEY; WILLIAMS, 2008; CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; CÁRCEL et al., 2012; CHANDRAPALA et al., 2012).

Do ponto de vista conceitual, o US é uma onda mecânica acústica que necessita de um meio para se propagar. As ondas acústicas são classificadas considerando a frequência audível pelo ouvido humano, que varia de 20 Hz a 20 kHz. Frequências abaixo de 20 Hz são referidas como infrassom e acima de 20 kHz como ultrassom (SUSLICK, 1989; KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011) (Figura 1). O US é classificado em dois grandes grupos, dependendo da sua frequência. US de alta frequência (1 - 20 MHz) possui baixa intensidade ($<1 \text{ W/cm}^2$) e não é destrutivo, tendo emprego em técnicas diagnósticas de imagens não invasivas, sensores e análises na medição da composição, maturação, eficácia de emulsificação e concentração ou dispersão de partículas em fluidos. Já as baixas frequências (20 - 100 kHz) desenvolvem níveis de intensidade mais altos (10 - 1000 W/cm^2), com

energia suficiente para romper enlaces intermoleculares, sendo que intensidades superiores a 10 W/cm^2 originam efeitos de cavitação, capaz de modificar algumas propriedades físicas e favorecer reações químicas (SUSLICK, 1989; PIYASENA, MOHAREB; McKELLAR, 2003; JAYASOORIYA et al., 2004).

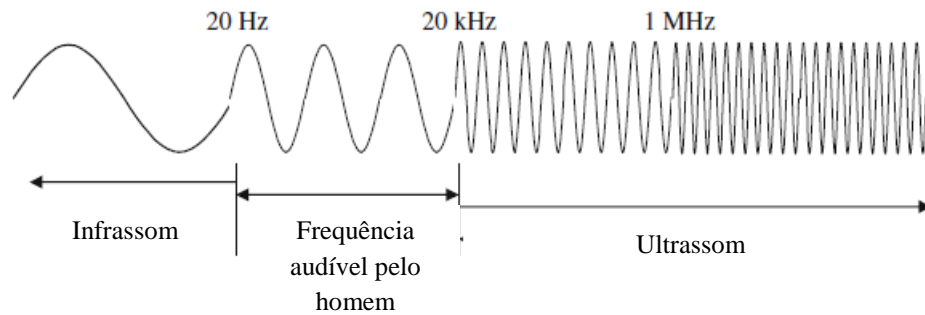


Figura 1 - Espectro do som.
Adaptado de KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011.

O US é produzido a partir de um transdutor, que converte a energia elétrica em energia mecânica sonora com frequências ultrassônicas. Esses transdutores geralmente são feitos de materiais cerâmicos piezoelétricos, como o titanato zirconato de chumbo (PZT), o titanato de bário e o metaniobato de chumbo. Os sistemas de aplicação de ultrassom mais usados na tecnologia de alimentos são os banhos e as sondas (Figura 2). Os banhos compõem um sistema de aplicação indireta, pois possuem o transdutor unido à base ou às paredes do tanque e a energia ultrassônica é transmitida ao líquido que preenche o recipiente, geralmente água, que transfere essa energia ao alimento imerso nesse líquido. No sistema de sondas a aplicação é direta, onde o sinal acústico é amplificado e dirigido diretamente ao alimento através da haste metálica, sem necessidade de adição de um meio líquido entre alimento e sonda (POVEY; MASON, 1998; LEADLEY; WILLIAMS, 2008).

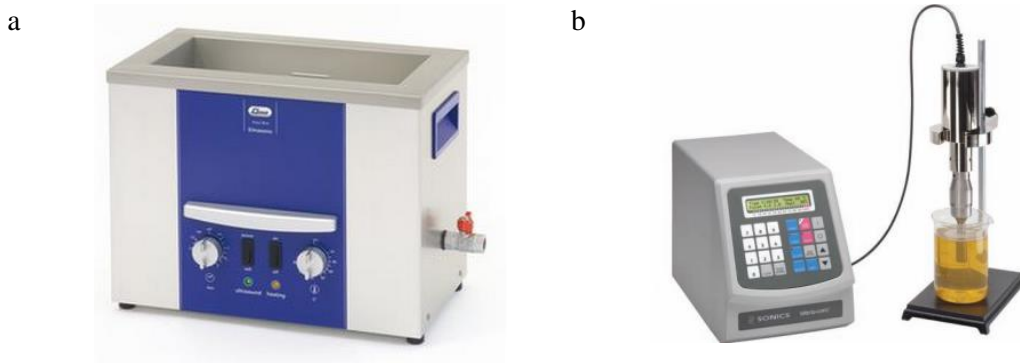


Figura 2 - Aparatos de US (a) Banho e (b) Sonda.

Fonte: Sites das empresas (a) Elma Company (www.elma-ultrasonic.com) (b) Sonic & Materials, Inc. (www.sonicsandmaterials.com).

1.1.2 Fenômeno de cavitação acústica

A cavitação acústica é responsável pela maioria dos efeitos do US observado nos alimentos e compreende basicamente o processo de formação e implosão de nano/microbolhas com alto conteúdo de energia. O fenômeno se origina quando a onda ultrassônica atravessa o meio, provocando alternância de ondas de compressão e rarefação que produzem bolhas (Figura 3). Baixas frequências e altas amplitudes geram efeitos de cavitação maiores que altas frequências (>1 MHz), em função de produzirem maior pressão acústica (SUSLICK, 1989).

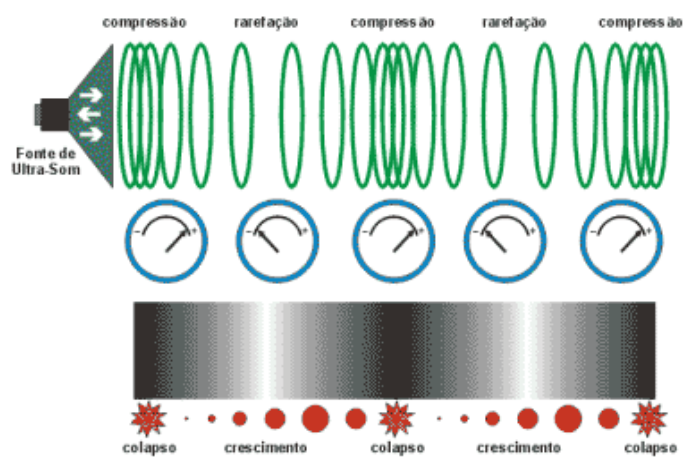


Figura 3 - Fenômeno de cavitação acústica.

A cavitação acústica pode ser estável ou instável. No caso da cavitação estável, a oscilação é regular e as bolhas induzem microagitação sem implodir. Na cavitação instável,

também referida como transiente, estas bolhas oscilam em estados de compressão/rarefação até ocorrer a implosão da bolha, com aumento de pressão e temperatura localizados, produzindo jatos contendo energia suficiente para desintegrar células e desnaturar enzimas (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011; KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011). Os gases e vapores do interior da cavidade da bolha são comprimidos, gerando intenso aquecimento e criando pontos de aquecimento, que se dissipam rapidamente (SUSLICK, 1989). De acordo com experimentos relatados por Suslick (1989), as taxas de aquecimento e resfriamento são de mais de um bilhão de graus centígrados por segundo. Hacias et al. (1997) citam que a energia liberada de um único colapso transiente é extremamente pequeno, mas com o colapso de milhões de bolhas a cada segundo o efeito cumulativo é amplo.

1.1.3 Ultrassom na ciência e tecnologia de carnes

Ondas de baixa frequência tem despertado interesse por mostrarem efeito positivo sobre a textura da carne. A maciez é um atributo de importância na avaliação pelo consumidor e diversas técnicas são utilizadas pela indústria para melhorar essa característica. A suspensão da carcaça pelo osso pélvico ao invés do tendão de Aquiles, a estimulação elétrica, o uso de enzimas proteolíticas e a injeção de soluções de salmouras, polifosfatos, ácidos e cloretos são apontadas como capazes de melhorar a maciez da carne, mas apresentam algumas desvantagens com relação à apresentação do produto e/ou custo (PRÄNDL et al., 1994; ORDÓÑEZ, 2005; AHNSTRÖM et al., 2012).

O efeito do US na carne deve-se basicamente aos efeitos de cavitação, principalmente a transiente (CHANDRAPALA et al., 2012). A capacidade destrutiva da cavitação e a vibração da onda ultrassônica levam ao enfraquecimento da estrutura muscular, com a ruptura das estruturas do colágeno e das miofibrilas (GOT et al., 1999; STADNIK; DOLATOWSKI, 2011). Além disso, a cavitação também causa danos à estrutura de organelas celulares, com a liberação de enzimas que atuam na melhora da maciez, como as catepsinas dos lisossomos, e de cálcio do retículo sarcoplasmático, o qual ativará o sistema enzimático calpaína, acelerando a proteólise (CHANDRAPALA et al., 2012). A atividade enzimática destas enzimas também poderá ser acelerada pelo aumento de temperatura que ocorre durante a exposição ao ultrassom (DICKENS et al., 1991; CHANDRAPALA et al., 2012). Outra consequência desse aquecimento é a desnaturação proteica, que poderia vir a contribuir com o amaciamento do músculo (JAYASOORIYA et al., 2007). Para obter efeitos sobre a textura,

parâmetros acústicos como frequência, amplitude, intensidade e potência, além do tempo de exposição e temperatura, devem ser considerados. As características do músculo analisado (corte, teor de gordura, quantidade de colágeno) também interferem diretamente nos resultados. Desde os primeiros estudos, busca-se inferir o efeito isolado desses fatores e qual a melhor combinação para o efeito desejado (ALVES et al., 2013).

1.1.4 Ultrassom e produtos fermentados

Em função da cavitação, especialmente a transiente, o US tem sido estudado na preservação de alimentos por romper células microbianas e desnaturar enzimas. O colapso das bolhas e a energia liberada na cavitação provocam afinamento das membranas celulares, aquecimento localizado e produção de radicais livres, sendo estes mecanismos capazes de eliminar micro-organismos (CHEMAT; ZILL-E-HUMA; KHAN, 2011). Contudo, as doses de radiação ultrassônica necessárias para obter efeito bactericida eficiente são altas e por isso o US vem sendo avaliado em conjunto com alta pressão (manosonicação), alta temperatura (termosonicação) ou ambos (manotermosonicação). Quando associado, o US apresenta efetividade comprovada frente a diversos micro-organismos patogênicos e deteriorantes, dependendo do tipo de micro-organismo, composição do alimento, tempo de exposição, amplitude da onda, entre outros fatores (PIYASENA, MOHAREB; McKELLAR, 2003; ERRIU et al., 2014).

Apesar de o US estar geralmente associado ao efeito deletério que provoca sobre os micro-organismos, estudos em diferentes matrizes mostraram que dependendo do tipo de micro-organismo e parâmetros acústicos utilizados a sonicação pode apresentar efeitos benéficos sobre o crescimento microbiano e o processo fermentativo (WU; HULBERT; MOUNT, 2001; PITT; ROSS, 2003; NIKOLIC et al., 2010; SULAIMAN et al., 2011; EWE et al., 2012). Enquanto o US de alta intensidade (<100 kHz) parece estar ligado à destruição mecânica de substâncias poliméricas e efeito bactericida, o US de baixa intensidade (>100 kHz) vem sendo associado com o estímulo do crescimento de micro-organismos e biofilmes (ERRIU et al., 2014). Ambos efeitos são atribuídos à cavitação, seja pela destruição da membrana celular ou pelo aumento no metabolismo e na taxa de transporte de oxigênio que o fenômeno provoca (QIAN; STOODLEY; PITT, 1996; PITT; ROSS, 2003). A prevalência de um ou outro efeito proporciona o efeito final de destruição ou de estímulo ao crescimento do micro-organismo (ERRIU et al., 2014).

A aplicação do US na biotecnologia e em bioprocessos como meio de promover o desenvolvimento de micro-organismos e seu metabolismo é considerada ainda subestimada (CHISTI, 2003; KWIATKOWSKA et al., 2011). O efeito em processos biológicos depende das condições acústicas, do micro-organismo e do alimento em questão (PUHL; MASON, 2001; PIYASENA; MOHAREB; McKELLAR, 2003) e estudos mostram que a radiação ultrassônica pode ser benéfica a muitos bioprocessos, inclusive fermentação (CHISTI, 2003; KWIATKOWSKA et al., 2011).

De acordo com estudo de Ewe et al. (2012), a cavitação foi capaz de romper estruturas de substratos em leite de soja, aumentando sua disponibilidade para os micro-organismos, além de alterar a permeabilidade da membrana celular, com a liberação de enzimas intracelulares. O uso de US aumentou o rendimento na produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* e por *Kluyveromyces marxianus* nos estudos de Nikolic et al. (2010) e de Sulaiman et al. (2011), respectivamente. Wu, Hulbert e Mount (2001) utilizaram sonda de ultrassom (20 kHz) antes e após a adição de inóculo em leite, verificando que a aplicação de ultrassom após a adição do inóculo reduziu o tempo de fermentação em 0,5 horas, enquanto quando aplicado antes da adição do micro-organismo não houve diferença do controle. Os autores alegam que a aplicação do US somente apresentou efeito quando aplicado após adição do inóculo em função da onda estimular a liberação de enzimas intracelulares do micro-organismo durante a sonicação. Nguyen, Lee e Zhou (2009) também estudaram o efeito da aplicação de sonda de US (20 kHz) em leite fermentado, observando que o tempo de fermentação reduziu em até 25%, dependendo do micro-organismo fermentador avaliado. Em estudo posterior, os autores utilizaram os mesmos parâmetros acústicos, relatando que o US acelerou a quebra da lactose em até quatro vezes, estimulando a capacidade fermentativa dos micro-organismos (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009; 2012).

Além do leite, o US apresentou benefícios ao processo de fermentação de outros alimentos, como nas bebidas alcoólicas saquê, vinho e cerveja (MATSUURA et al., 1994) e em sucos de frutas (COSTA et al., 2013). Ainda assim, os trabalhos disponíveis concentram-se sobre a microbiologia e fermentação de alimentos líquidos e com vida de prateleira curta. O conhecimento do efeito do US sobre a microbiota de alimentos de consistência mais sólida e de vida de prateleira mais extensa, como o salame, ainda é incipiente.

1.1.5 Salame

A produção do salame no Brasil começou com a chegada dos imigrantes italianos e hoje representa uma parcela significativa dos embutidos fermentados comercializados no país. Por definição, o salame é considerado como o produto elaborado a partir de carne moída e gordura, misturado com sais, agentes de cura e especiarias, embutido em envoltórios naturais ou artificiais e submetidos às etapas de fermentação e desidratação/maturação, onde micro-organismos e enzimas possuem papel crucial (LÜCKE, 1994). De modo geral, são cerca de 30 a 40 dias na etapa de processamento do salame tipo Italiano, na qual ocorre a fermentação e inicia-se a maturação, adquirindo características que possibilitam o consumo do produto, sendo que a maturação ainda segue ao longo do armazenamento (TERRA; FRIES; TERRA, 2004). A legislação brasileira (BRASIL, 2000) prevê oito tipos de salame, com especificidades quanto à matéria-prima, granulometria do toucinho e condimentos. Dentre os mais consumidos, o Salame tipo Italiano é definido como o produto fermentado elaborado com carnes suínas ou suínas e bovinas com adição de toucinho, moídos em granulometria média entre 6 e 9 mm, embutidos em envoltórios naturais ou artificiais, podendo ser curado, defumado ou maturado. A mesma normativa prevê que o produto possua atividade de água <0,90, umidade <35%, gordura <32%, proteína >25% e carboidratos totais <4% (BRASIL, 2000).

A fabricação do salame ocorre em câmara com temperatura e umidade controladas, em duas fases complementares: fermentação e maturação. A fermentação ocorre nos primeiros dias e é responsável pela acidificação e formação de cor. Esta queda de pH leva ao ponto isoeletrico das proteínas da carne, com a formação de um gel e expulsão da água. Esta etapa dá início à fase de maturação, caracterizada pela desidratação e formação de aroma e sabor do produto (ORDÓÑEZ, 2005).

As culturas de micro-organismos usadas na fermentação do salame geralmente são compostas de bactérias lácticas (*Lactobacillus* e/ou *Pediococcus*), responsáveis pela acidificação, e por bactérias que proporcionam sabor e aroma ao produto (gêneros pertencentes à família *Micrococcaceae*) (HUGAS; MONFORT, 1997). O efeito do US sobre estes micro-organismos específicos é desconhecido até o momento, abrindo espaço para verificar o impacto do US tanto sobre estas culturas quanto no processo fermentativo do salame.

Dentre as diversas características sensoriais do salame, o aroma e a cor constituem fatores decisivos no momento da aquisição do produto pelo consumidor (TERRA; FRIES; TERRA, 2004; MARCHESI et al., 2006). Compostos voláteis responsáveis pelo aroma do salame são gerados a partir da combinação de atividade enzimática microbiana e endógena e reações químicas (CARBALLO, 2012), oriundos da fermentação de carboidratos (SPAZIANI; DEL TORRE; STECCHINI, 2009) e do metabolismo das bactérias ácido-lácticas e de *Staphylococcus xylosus* (HUGAS; MONFORT, 1997). A atividade enzimática de lipases e proteases também são essenciais para formação de moléculas de alto impacto sensorial (TABANELLI et al., 2013). Estudos mostram que o US pode atuar inativando ou estimulando a atividade de enzimas em alimentos, dependendo da frequência, intensidade, tempo de exposição e estrutura da enzima (MASON; PANIWNYK; LORIMER, 1996; MAWSON et al., 2011). Em carnes e derivados, até o presente momento, não foi avaliado o efeito da sonicação sobre produtos oriundos da atividade enzimática, tampouco sobre seus compostos voláteis. O US também pode interferir na estabilidade oxidativa de lipídios e proteínas do salame, uma vez que radicais gerados durante a sonicação podem atuar como pró- ou antioxidantes (ASHOKKUMAR et al., 2008; KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011).

Com relação à cor, o uso de US apresentou resultados controversos em carnes. Jayasooriya et al. (2007) e Stadnik e Dolatowski (2011) não observaram efeito da aplicação do US sobre parâmetros instrumentais de cor (L^* , a^* e b^* do sistema CIELAB), enquanto Pohlman et al. (1997), Chang et al. (2012) e Hu et al. (2014) afirmam que a sonicação interfere nestes parâmetros. Os radicais formados na exposição ao US poderiam atuar sobre os pigmentos cárneos do salame que são suscetíveis à oxidação, e por isto a avaliação instrumental da cor e dos pigmentos neste produto quando sonicado é relevante.

Além do aroma e da cor, a textura do salame também é importante para o consumidor. Após a fermentação, a secagem é o principal fator que atua sobre as propriedades reológicas do produto (GONZALEZ-FERNÁNDEZ et al., 2006). Textura macia pode ser um atributo positivo em alguns embutidos fermentados (*chorizo*) (MELENDO et al., 1996), enquanto em outros (*chorizo de Pamplona*) considerado como um defeito (GIMENO; ASTIASARAN; BELLO, 1999). No salame, textura muito dura, geralmente procedente da desidratação excessiva, e pode prejudicar a qualidade do produto por dificultar a fatiabilidade e a mastigação. Tendo o US apresentado efeito sobre a textura da carne, é interessante verificar como este influencia parâmetros de textura no salame. Além dos mecanismos já citados sobre

como o US interfere na maciez, a sonicação pode afetar a textura por acelerar o processo de transferência de massa. A sonicação diminui a pressão sobre as partículas e favorece a perda de água, podendo acelerar a desidratação (MASON, PANIWNKYK; LORIMER, 1996; DOLATOWSKI; STADNIK; STASIAK, 2007; LEADLEY; WILLIAMS, 2008; SIRÓ et al., 2009).

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Experimentos preliminares

Para delimitar as condições a serem usados no experimento final foram necessários testes preliminares, uma vez que o uso do US na produção de salame é desconhecido na literatura. Os métodos analíticos utilizados nestes testes foram os mesmos adotados no experimento final e estão descritos posteriormente nos manuscritos e artigos científicos. Nestes experimentos preliminares foram avaliados principalmente:

- Tipo de aparato a ser utilizado (banho US ou sonda US);
- Tempo de exposição;
- Suscetibilidade da cultura usada na produção do salame ao US;
- Frequência do US.

Os principais resultados obtidos nestes experimentos encontram-se no Apêndice A.

1.2.2 Parâmetros adotados para experimento final

No intuito de avaliar não somente o efeito do US sobre a cultura de micro-organismos e o processo fermentativo do salame, mas também visando a melhora da textura do produto, optou-se por usar no experimento final a frequência de 25 kHz, descrita por alguns autores como capaz de melhorar a maciez da carne (JAYASOORIYA et al., 2007; HU et al., 2014). Na frequência de 25 kHz a cavitação é mais intensa do que a 45 kHz ou 130 kHz e poderia prejudicar a viabilidade da cultura, mas em temperatura ambiente (~25°C) a sonicação não é efetiva na inativação de micro-organismos sem estar aliada a altas pressões ou temperaturas (PIYASENA, MOHAREB; McKELLAR, 2003; ERRIU et al., 2014). Por ter efeitos mais pronunciados de cavitação, esta frequência também foi adotada visando avaliar o efeito do US sobre a oxidação lipídica e proteica, pigmentos/cor do salame e sobre a formação de compostos voláteis.

Sendo assim, foi definido para o experimento final o uso de banho de US como aparato, com frequência de 25 kHz, pelos tempos de exposição de 3 min, 6 min e 9 min, além de um controle não sonicado. Os tratamentos foram definidos ponderando tempos de exposição de estudos em que a viabilidade de micro-organismos foi aumentada em substratos

sonicados (WU; HULBERT; MOUNT, 2001; PITT; ROSS, 2003; NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009, 2012) e a maciez da carne foi melhorada (SMITH et al., 1991; JAYASOORIYA et al., 2007).

1.2.3 Produção dos salames tipo Italiano

Os salames tipo Italiano foram preparados na Planta Piloto de Carnes do Depto. De Tecnologia e Ciência de Alimentos (DTCA/UFSM), conforme formulação proposta por Cichoski et al. (2009) a partir da mistura de 60% carne suína (pernil) moída em disco de 10 mm, 30% carne bovina (paleta) moída em disco de 5 mm, 10% gordura retirada da paleta suína e moída em disco 10 mm, 0,3% cura para salames, 0,25% eritorbato de sódio, 1% condimento para salame tipo Italiano (todos fornecidos pela Kraki Kienast & Kratschmer Ltda, Santo André, SP), 1% sacarose (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, RJ), 1% de sal de cozinha e cultura para salame (Lyocarni VBM-60, Sacco Brasil, Campinas, SP; composta de *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus*, *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici*) previamente ativada conforme proposto por Terra (2001) e adicionada conforme recomendações do fabricante (20 g cultura para cada 100 kg massa). Todos os ingredientes foram adicionados em misturadeira (modelo MJI 35, Jamar LTDA, Tupã, SP) e misturados por 15 minutos. A massa foi então embutida (embutideira modelo PJI-09, Jamar LTDA, Tupã, SP) em tripas sintéticas com diâmetro de 60 mm (Kraki Kienast & Kratschmer Ltda, Santo André, SP) previamente tratada com solução de ácido acético a 5% por 30 minutos (TERRA, 2001). Os salames mediram de 15 a 18 cm de comprimento e tiveram peso médio entre 400 g e 450 g.

Após o embutimento, os salames foram empacotados em embalagens plásticas de polietileno (Figura 1) (embaladora modelo 200B, Selovac, São Paulo, SP). Esta embalagem foi adotada em virtude de os salames desembalados absorverem água quando expostos ao US, conforme observado em testes prévios.



Figura 1 - Salame envasado em embalagem plástica para ser submetido a sonicação.
Fonte: O Autor.

1.2.4 Tratamento com US

Os salames foram selecionados aleatoriamente para compor os quatro lotes de tratamentos. Para sonicação foi usado banho 25 kHz no modo normal (Elma[®] TI-H 5, Singen, Alemanha; 500 W) com metade do volume máximo de água (cerca de 2,4 litros) (Figura 2a,b,c), sendo a água renovada após cada sonicação e ajustada para 20 ± 1 °C. A cada batelada, a temperatura inicial e final da água foi registrada, sendo observado aumento máximo de 3 °C (tempo de exposição 9 min). Cada lote foi submetido ao US por 0 (controle), 3, 6 ou 9 minutos, compondo os quatro tratamentos deste experimento.

A potência fornecida foi calculada usando o método calorimétrico descrito por Koda et al. (2003), usando a fórmula:

$$P = m.C.(\Delta T/\Delta t)$$

onde m é a massa de água sonicada (2400 g), C é o calor específico da água ($4,18 \text{ J. kg}^{-1}. \text{ K}^{-1}$) e $\Delta T/\Delta t$ a razão entre a variação de temperatura e o tempo de sonicação específicos de cada tratamento.

Foram sonicados quatro salames por batelada, sendo dispostos dois salames embaixo e dois em cima, conforme mostrado na Figura 2d,e. Na metade do tempo de cada tratamento, os salames foram invertidos (os de baixo colocados em cima e virados de lado) para que a sonicação ocorresse de forma mais homogênea possível em todas as amostras. Para evitar que os salames flutuassem, foi necessário cobrir os salames um peso de 800 g feito com chumbadas embaladas a vácuo (Figura 2f).

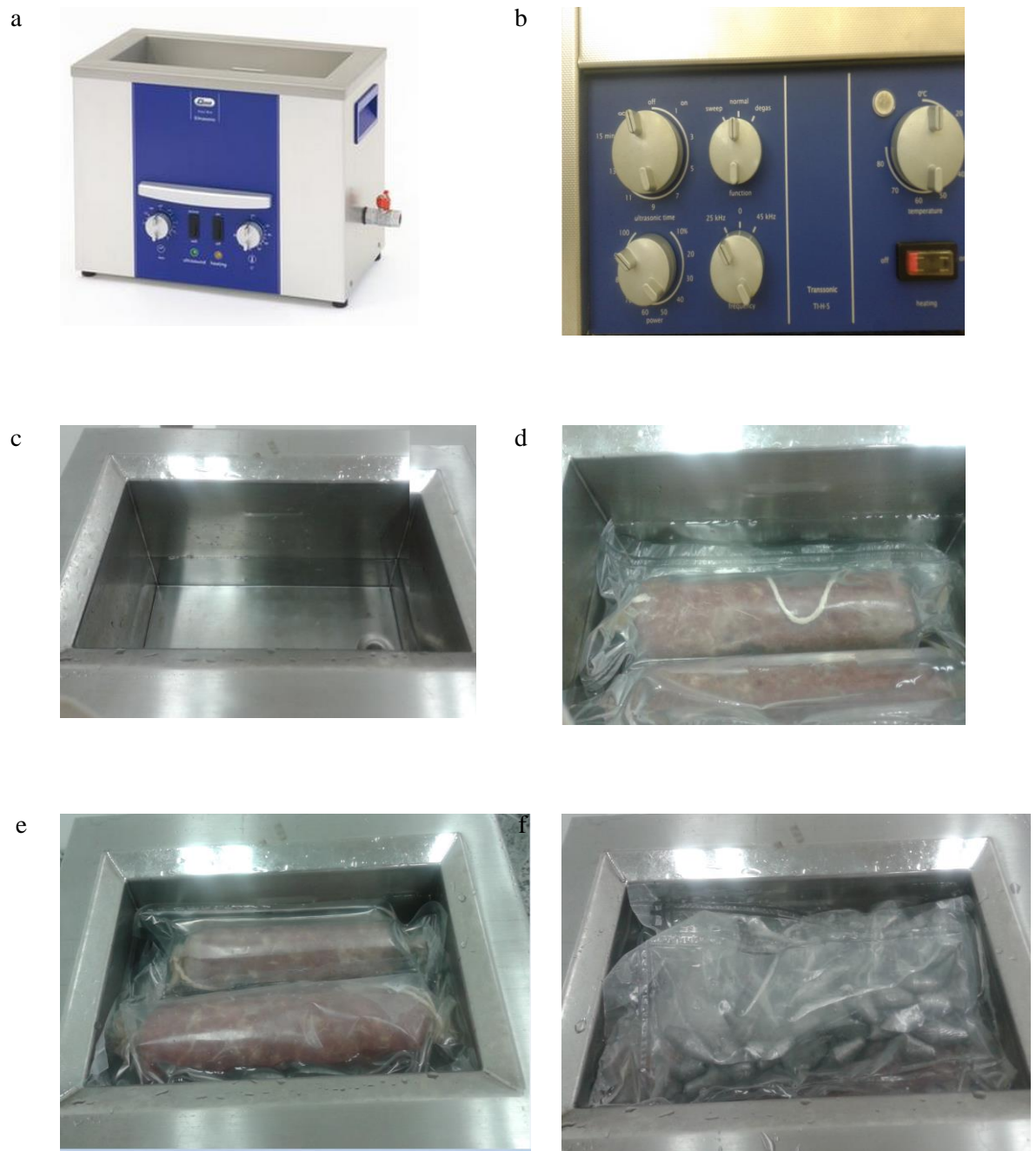


Figura 2 - Sonicação dos salames. (a) Visão geral do banho US 25 kHz (b) Visão frontal do banho US (c) Banho US com água antes da sonicação (d), (e) Disposição dos salames no banho US (f) Salames cobertos com chumbadas durante a sonicação.

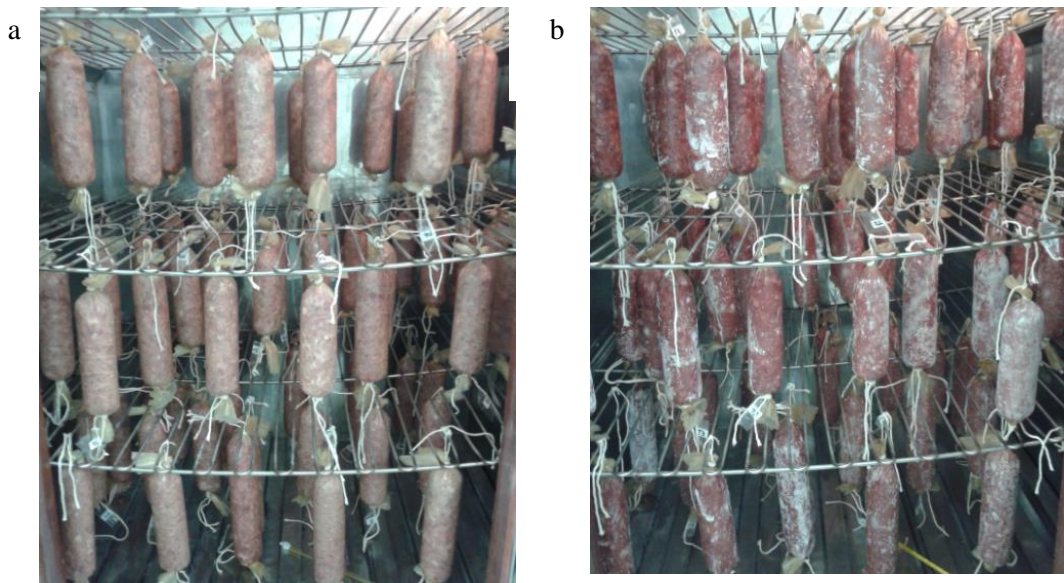
Fonte: O Autor.

Após a sonicação, os salames foram retirados da embalagem plástica e pesados para acompanhamento da perda de peso por desidratação na câmara.

1.2.5 Fermentação e maturação dos salames tipo Italiano

Os salames foram dispostos aleatoriamente na câmara de fermentação / maturação (Menoncin Ind. Com. LTDA, Erechim, RS), onde permaneceram por 28 dias (Figura 3). A programação de umidade relativa (UR) e temperatura seguiu proposta de Cichoski et al. (2009), sendo a seguinte: 1º dia: 95 %UR e 25 °C; 2º dia: 92 %UR e 24 °C; 3º dia 89 %UR e 23 °C; 4º dia: 86 %UR e 22 °C; 5º dia: 83 %UR e 21 °C; 6º dia: 80 %UR e 20 °C; 7º dia: 80 %UR e 19 °C; 8º ao 28º dia: 75 %UR e 18 °C. Em função de a umidade e a temperatura não serem totalmente homogêneas no interior da câmara, na metade do tempo (14 dias), os salames foram redistribuídos.

O fim da etapa de processamento e retirada dos salames da câmara foi determinado pelo valor de atividade de água dos mesmos, seguindo recomendação da legislação brasileira, a qual preconiza que salames tipo Italiano devem apresentar atividade de água máxima de 0,90 para serem considerados seguros para consumo (BRASIL, 2000). A perda de peso dos salames ao final do processamento foi de 30 a 40% em relação ao peso inicial e está de acordo com valores citados por Terra, Fries e Terra (2004) para este produto.



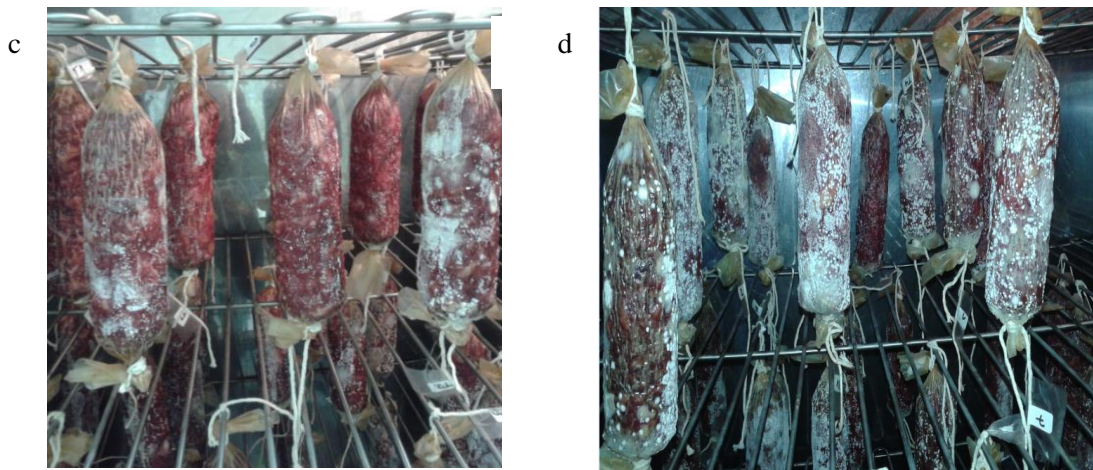


Figura 3 - Salames durante permanência na câmara de fermentação / maturação. (a) Dia zero (b) 10 dias (c) 15 dias (d) 28 dias.

Fonte: O Autor.

1.2.6 Armazenamento e amostragem

Os salames foram analisados durante o período de processamento (0, 2, 14 e 28 dias na câmara) e ao longo da vida de prateleira (após 30 e 120 dias de armazenamento), considerando que salames comerciais geralmente possuem validade de quatro meses. O ponto de saída da câmara também foi considerado como dia 1 do armazenamento.

Para avaliação na vida de prateleira, os salames foram retirados da tripa e empacotados a vácuo (nível 3 do vacuômetro) em embalagem plástica de polietileno de baixa densidade e nylon de 30 μ com barreira ao oxigênio <30 cm do gás/ m^2 .dia.atm (embaladora modelo 200B, Selovac, São Paulo, SP). Buscando simular condições comerciais, os salames foram expostos à temperatura ambiente (15 – 25 °C) sem abrigo da luz.

A cada ponto de análise, os salames foram avaliados em triplicata a partir de dois salames independentes de cada tratamento, com exceção das análises de textura e compostos voláteis, que foram analisados a partir de três salames independentes de cada tratamento. Para amostragem, após análise microbiológica e de cor, uma parte do salame teve a gordura aparente retirada manualmente e a porção sem gordura moída com mixer doméstico em béquer imerso em água com gelo para evitar superaquecimento. Esta amostra sem gordura foi usada para análises de oxidação proteica e pigmentos, enquanto o restante do salame (com

gordura) usado para as demais análises, cuidando para que a coleta de amostra fosse homogênea.

1.2.7 Análises

As análises realizadas e suas respectivas metodologias estão descritas nos manuscritos e artigos científicos, a seguir.

MANUSCRITO 1

**IMPLICAÇÕES DO USO DE ULTRASSOM SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS,
QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E TEXTURA DE SALAME TIPO ITALIANO**

**Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido ao periódico Food
Bioprocess Technology**

[Versão em Português]

(Configurado conforme as normas da Revista – Anexo A)

ORIGINAL PAPER**Implicações do Uso de Ultrassom sobre Características Físicas, Químicas,
Microbiológicas e Textura de Salame Tipo Italiano**

**Larissa de Lima Alves¹, Marianna Stefanello da Silva¹, Diego Rafael Martins Flores¹,
Dirceu Rodrigues Athayde¹, Amanda Roggia Ruviano¹, Débora Brum¹, Vanessa
Batista¹, Renius de Oliveira Mello¹, Cristiano Ragagnin de Menezes¹, Paulo Cezar
Bastianello Campagnol¹, Roger Wagner¹, Juliano Smanioto Barin¹, Alexandre José
Cichoski^{1*}**

¹Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av. Roraima, 1000. Cidade Universitária.
Bairro Camobi. CEP 97105-900. Santa Maria, RS, Brasil.

Fone +55-55-3220-8254; Fax: +55-55-3220-8254

*Autor para correspondência: Alexandre José Cichoski. (cijoale@gmail.com)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de ultrassom (US, banho 25 kHz, 500 W) sobre o crescimento de bactérias *starter*, a_w , cor, oxidação lipídica e proteica, pigmentos heme totais, ferro não heme, metamioglobina e textura de salame tipo Italiano durante o processamento (dias 0, 2, 15 e 28) e ao longo da vida de prateleira (após 1, 30 e 120 dias). Foram estudados três tempos de sonicação (3 min, 6 min e 9 min), além de um controle (não tratado com US, 0 min). O US exerceu efeito positivo no crescimento das bactérias em algumas etapas do processamento e do armazenamento ($p < 0,05$), principalmente sobre *Micrococcaceae* e com 9 min de exposição. O pH, a_w e parâmetros de cor não foram afetados de maneira significativa pelo US ($p > 0,05$). A oxidação de lipídios e proteínas foi acelerada com o US, contudo mantendo valores aceitáveis. Os pigmentos heme totais, ferro não heme e metamioglobina foram afetados pelo US ($p < 0,05$) e relacionados com as reações oxidativas ($p < 0,05$). O US não teve efeito nos parâmetros do perfil de textura ($p > 0,05$), contudo dureza e mastigabilidade mostraram tendência a reduzirem com a sonicação. Este estudo mostrou que o US pode influenciar no crescimento das bactérias estudadas e apresenta potencialidades a serem exploradas no processamento de salame tipo Italiano.

Palavras-chave: bactérias lácticas, *Micrococcaceae*, oxidação lipídica, oxidação proteica, sonicação, fermentação.

Introdução

O salame tipo Italiano é um produto embutido fermentado elaborado com carnes suínas ou suínas e bovinas com adição de toucinho moído, podendo ser curado, defumado ou maturado (Lucke, 1994; Brasil 2000). A etapa de processamento dura de 30 a 40 dias e é caracterizada por duas fases (fermentação e início da maturação), ao passo que a vida de prateleira se estende por cerca de 120 dias (Terra et al. 2004). Tecnologias emergentes como o ultrassom (US) vem sendo exploradas nas últimas décadas em diversos alimentos e com muitas finalidades (Mason et al. 1996; Nguyen et al. 2009; Chemat et al. 2011; Awad et al. 2012; Chandrapala et al. 2012; Cárcel et al. 2012; Alarcon-Rojo et al. 2015), mas não foram encontrados estudos que avaliassem as implicações de seu uso em salame. Este produto apresenta particularidades interessantes para serem estudadas quando uma nova tecnologia é adotada em seu processamento, sendo que algumas já mostraram ser passíveis da influência do US em outros alimentos. O uso de cultura de bactérias starter, o processo fermentativo, a desidratação sofrida ao longo do tempo, a elevada atividade enzimática, o alto conteúdo de gordura, a cor e a textura como atributos de qualidade e a ampla vida de prateleira são algumas destas características.

O US é uma onda mecânica acústica com frequência acima de 20 kHz que vem sendo considerado como meio de alterar as características de um processo ou produto por seus efeitos sobre as propriedades físicas, químicas, bioquímicas e microbiológicas em alimentos (Puhl e Mason 2001). Tais efeitos geralmente são atribuídos ao fenômeno de cavitação acústica, produzido quando são usadas baixas frequências (<100 kHz). A cavitação se origina quando a onda ultrassônica atravessa um meio líquido provocando alternância de ondas de compressão e rarefação, produzindo bolhas no líquido. Se a cavitação for estável, as bolhas apenas produzirão microagitação no líquido sem implodir. Se for instável, ocorre implosão da bolha com aumento de pressão e temperatura localizados, liberando microjatos com alto conteúdo de energia, capaz de acelerar reações químicas, danificar células e afetar macromoléculas e enzimas (Suslick 1989; Chemat et al. 2011; Chandrapala et al. 2012; Alarcon-Rojo et al. 2015; Ashokkumar 2015).

A relação do US com reações químicas é amplamente estudada pela sonoquímica (Suslick 1989), mas poucos trabalhos avaliaram seu impacto na oxidação lipídica e proteica da carne e de produtos cárneos. Stadnik and Dolatowski (2008) e McDonnell et al. (2014b) não observaram alterações oxidativas após sonicação em carne bovina e suína,

respectivamente, enquanto Chang and Wong (2012) relataram aumento da oxidação dos lipídios em peixe cobia (*Rachycentron canadum*) e Cichoski et al. (2015) notaram redução da oxidação lipídica em salsichas pasteurizadas com US. A oxidação proteica é ainda menos estudada em alimentos sonicados.

Em função da cavitação, o US é estudado por seu efeito antimicrobiano, embora já esteja claro que só é eficiente quando associado a outras tecnologias, como temperatura, pressão ou ácidos (Piyasena et al. 2003; Turantaş et al. 2015). A aplicação do US na biotecnologia e em bioprocessos como meio de promover o desenvolvimento de microorganismos e seu metabolismo é considerada subestimada (Chisti 2003; Kwiatkowska et al. 2011). O efeito em processos biológicos depende das condições acústicas, do microorganismo e do alimento em questão (Puhl e Mason 2001; Piyasena et al. 2003) e estudos mostram que a radiação ultrassônica pode ser benéfica a muitos bioprocessos, inclusive fermentação (Chisti 2003; Kwiatkowska et al. 2011). No entanto, os trabalhos disponíveis concentram-se sobre a microbiologia e a textura em carne e na fermentação de alimentos líquidos e com vida de prateleira curta.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da aplicação do US na produção de salame tipo Italiano sobre o processo fermentativo, crescimento de bactérias, desidratação, parâmetros de cor, reações oxidativas e perfil de textura do produto durante seu processamento e ao longo de sua vida de prateleira.

Materiais e Métodos

Formulação dos Salames tipo Italiano

Os salames foram preparados conforme formulação proposta por Cichoski et al. (2009) a partir da mistura de 60% de pernil suíno moído em disco de 10 mm, 30% de paleta bovina moída em disco de 5 mm, e 10% gordura retirada da paleta suína e moída em disco 10 mm, adquiridos no comércio local (Santa Maria, RS, Brasil). Foram acrescentados 0.3% cura para salames, 0.25% eritorbato de sódio, 1% condimento para salame tipo Italiano (Kraki Kienast & Kratschmer Ltda, Santo André, Brasil), 1% sacarose (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil), 1% de sal de cozinha e cultura para salame (Lyocarni VBM-60, Sacco Brasil, Campinas, Brasil; composta de *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus*,

Pediococcus pentosaceus e *Pediococcus acidilactici*) previamente ativada conforme proposto por Terra (2001) e adicionada conforme recomendações do fabricante (20 g cultura/100 kg massa). Todos os ingredientes foram adicionados em misturadeira (modelo MJI 35, Jamar LTDA, Tupã, Brasil) e misturados por 15 minutos. A massa foi embutida (embutideira modelo PJI-09, Jamar LTDA, Tupã, Brasil) em tripas sintéticas com diâmetro de 60 mm (Kraki Kienast & Kratschmer Ltda, Santo André, Brasil) previamente tratada com solução de ácido acético a 5% por 30 minutos (Terra 2001). Os salames mediram de 15 a 18 cm de comprimento e tiveram peso médio entre 400 g e 450 g. Todos os salames tiveram a mesma formulação, independentemente do tratamento.

Após o embutimento, os salames foram empacotados em embalagens plásticas de polietileno (embaladora modelo 200B, Selovac, São Paulo, Brasil, vacuômetro nível 3). Esta embalagem foi necessária em virtude de os salames desembalados absorverem água no banho de US, conforme observado em testes prévios.

Tratamento com US

Os salames foram selecionados aleatoriamente para compor os quatro lotes de tratamentos. Para sonicação foi usado banho 25 kHz no modo normal (Elma[®] TI-H 5, Singen, Alemanha; potência nominal 500 W) com metade do volume máximo de água (cerca de 2,4 litros), sendo esta renovada após cada sonicação e ajustada para 20 °C. Cada lote foi submetido ao US por 0 (controle, não sonicado), 3, 6 ou 9 minutos, compondo os quatro tratamentos deste experimento. A frequência e os tempos de exposição ao US foram determinados após revisão de literatura e em experimentos prévios (dados não mostrados). A potência fornecida foi determinada pelo método calorimétrico (Koda et al. 2003), considerando a variação de temperatura média observada nos diferentes tempos de exposição, obtendo-se o valor de 128 W para o tempo de 3 min. Foram sonicados quatro salames por batelada, sendo que na metade do tempo de cada tratamento os salames foram invertidos para que a sonicação ocorresse de forma mais homogênea possível em todas as amostras. Após, os salames foram retirados da embalagem plástica e pesados para acompanhamento da perda de peso durante a etapa de processamento.

Fermentação e maturação dos salames

Os salames foram dispostos aleatoriamente dentro de uma câmara específica (Menoncin Ind. Com. LTDA, Erechim, Brasil), onde permaneceram por 28 dias até atingirem atividade de água 0,90, recomendada pela legislação brasileira (Brasil 2000). A programação de umidade relativa (UR) e temperatura seguiu proposta de Cichoski et al. (2009): 1º dia: 95 %UR e 25 °C; 2º dia: 92 %UR e 24 °C; 3º dia: 89 %UR e 23 °C; 4º dia: 86 %UR e 22 °C; 5º dia: 83 %UR e 21 °C; 6º dia: 80 %UR e 20 °C; 7º dia: 80 %UR e 19 °C; 8º ao 28º dia: 75 %UR e 18 °C. Em função da umidade e temperatura não serem totalmente homogêneas no interior da câmara, na metade do tempo (14 dias), os salames foram redistribuídos. A perda de peso dos salames ao final do processamento foi de 30 a 40% e está de acordo com valores citados para este produto (Terra et al. 2004).

Os salames foram analisados imediatamente depois da sonicação (dia 0), após 2 dias (dia 2), 15 dias (dia 15) e no fim do processamento (28 dias). Os mesmos dados do fim do processamento (28 dias) foram considerados para o ponto inicial da vida de prateleira (dia 1), sendo ainda realizadas análises após 30 e 120 dias de armazenamento. Para avaliação durante estocagem, os salames foram retirados da tripa logo após saída da câmara e empacotados a vácuo em embalagem plástica de polietileno de baixa densidade e nylon de 30 µ com barreira ao oxigênio TPO₂ <30 cm gás/m².dia.atm (embaladora modelo 200B, Selovac, São Paulo, Brasil), seguidos de armazenamento em temperatura entre 15 e 25°C, sem abrigo da luz. A composição centesimal foi determinada após 20 dias de armazenamento e estava de acordo com o preconizado pela legislação brasileira (Brasil 2000) (umidade <35%, gordura <32%, proteína <25% e carboidratos <1,5%).

Amostragem

Todas as análises foram realizadas em triplicata a partir de dois salames independentes. Após análise microbiológica, uma parte do salame teve a gordura aparente retirada manualmente e a porção sem gordura foi moída em mixer (modelo RI 1364/04, Philips Walita, Barueri, Brasil) por 1 min em béquer imerso em água com gelo para evitar superaquecimento. Esta amostra sem gordura foi usada para análises de oxidação proteica e pigmentos. O restante do salame com gordura foi usado nas demais análises, com exceção do perfil de textura em que foram usados salames inteiros independentes.

Análises microbiológicas

Foram coletados assepticamente 25 g de amostra diluídos em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia), seguido de homogeneização em *stomacher* (Modelo MK 1204, Boitton Instrumentos, Porto Alegre, Brasil) e após preparadas diluições subsequentes. A determinação do número de colônias de bactérias lácticas foi realizada através de semeadura em profundidade e com sobre camada usando o meio MRS (Man Rogosa Sharp, Acumedia Neogen Corp., Lansing, EUA), seguido de incubação a 37 °C por 48 horas (Stahnke 1995). Para melhor identificar as colônias, foi adicionado solução de anilina a 4% (p/v) na proporção de 0,3% (v/v) no meio MRS, conforme sugerido por Dalla Santa (2008). As bactérias da família *Micrococaceae* foram semeadas em profundidade em meio MSA (Manitol Salt Agar, Acumedia Neogen Corp., Lansing, EUA) com incubação a 30 °C por 72 horas (Stahnke 1995). Os resultados foram expressos em log UFC.g⁻¹.

Análise de pH

Foi realizada em potenciômetro digital (Digimed – DM-22, São Paulo, SP) usando eletrodo de vidro, com 5 g de amostra homogeneizadas em mixer com 50 mL água destilada (Lutz 2008).

Atividade de água e avaliação instrumental de cor

Os valores de a_w foram determinados em equipamento Aqualab[®] (Water Active Meter, versão 8, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, EUA) à temperatura de 25°C. A avaliação instrumental dos parâmetros de cor CIE L* (luminosidade), a* (*redness*) e b* (*yellowness*) (Commission Internationale de l'Éclairage 1976) foram realizadas em aparelho Minolta Chroma Meter CR-300 com iluminante D65 e ângulo de 10° (Minolta Corp., Ramsey, NJ). Para leitura, diferentes porções do salame foram distribuídas em uma placa de Petri (diâmetro 10 cm) e a leitura feita em seis pontos distintos aleatórios.

Medidas de oxidação lipídica e proteica

O acompanhamento da oxidação lipídica foi feito através da determinação do valor de peróxidos (VP, mEq peróxidos kg amostra⁻¹) (Shanta and Decker 1994) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, mg malonaldeído kg amostra⁻¹) (Raharjo et al. 1992; Wang et al. 2002).

A oxidação de proteínas foi avaliada pela quantificação do grupo tiol (nanomol tiol mg proteína⁻¹), determinados espectrofotometricamente após derivatização com o reagente de Ellmann (DTNB). A concentração de proteína foi mensurada espectrofotometricamente a 280 nm usando curva preparada com albumina sérica bovina (Ellman 1959).

Pigmentos heme totais, ferro não heme e metamioglobina

Os pigmentos heme totais (PHT, µg hematina g⁻¹) foram determinados por extração com acetona acidificada de acordo com Hornsey (1956). A dosagem de ferro não heme (FeNH, µg g⁻¹) foi feita pelo método Ferrozine segundo metodologia de (Ahn et al. 1993). Para quantificar a formação de metamioglobina (MMb, %) foi usada a metodologia de Krzywicki (1982).

Perfil de textura

Avaliações com relação à textura foram realizadas em salames com 90 dias de armazenamento, sendo três amostras independentes de cada tratamento avaliadas em sextuplicata. As análises foram conduzidas em equipamento TA-XT2 Plus (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Inglaterra) usando software Exponent version 6.1.1.0 (Texture Technologies Corp., New York, EUA), de acordo com orientações de Bourne (1978). Cada salame foi fatiado em seis porções, das quais foram retirados cubos de 2 cm de aresta do centro de cada fatia, descartando a camada mais externa. Foi usada probe cilíndrica de alumínio (45 mm diâmetro), célula de carga de 50 kg (calibrada com 10 kg) e as análises foram realizadas com dupla compressão a 50% da espessura original com velocidade de 1 mm

s⁻¹ e tempo de relaxamento de 5 s. Foram determinados os parâmetros de coesividade, flexibilidade, mastigabilidade e dureza (N).

Delineamento experimental e análise estatística

Os tratamentos compostos pelos diferentes tempos de sonicação (*US*, 0, 3, 6 e 9 min) e diferentes tempos de processamento (*t_p*, 0, 2, 15 e 28 dias) e de vida de prateleira (*t_a*, 1, 30 e 120 dias de armazenamento) foram analisados em delineamento inteiramente casualizado com esquema de parcela subdividida (*split-plot*), conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \omega_{ij} + \beta_k + (\alpha\beta)_{ik} + e_{ijk}$$

em que, Y_{ijk} é o valor observado no i -ésimo tempo de ultrassom (parcela) e j -ésima repetição sob o k -ésimo tempo de processamento ou armazenamento (subparcela); μ é o intercepto (resposta média geral de todas observações), ou seja, denota a média geral da variável resposta; α_i é o efeito fixo do i -ésimo tempo de ultrassom; ω_{ij} é o erro da parcela (erro A), assumindo $NIID(0, \sigma_\omega^2)$; β_k é o efeito fixo do k -ésimo tempo de processamento ou armazenamento; $(\alpha\beta)_{ik}$ é o efeito fixo da interação do i -ésimo tempo de ultrassom com o k -ésimo tempo de processamento ou armazenamento; e_{ijk} é o erro da sub-parcela (erro B), supondo $NIID(0, \sigma_e^2)$; pressuposto que os erros ω_{ij} e e_{ijk} são independentes um do outro.

Os dados foram submetidos a análise de variância univariada (ANOVA) pelo procedimento GLM, suas médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários com o comando LSMEANS e comparadas pela diferença mínima significativa (teste de t) ao nível de 5% de significância. Adicionalmente, também foi realizada estatística descritiva e análise de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas.

Posteriormente, os dados foram sujeitos a análise de variância multivariada (MANOVA) complementada pela técnica de componentes principais utilizando os procedimentos GLM, PRINQUAL, PRINCOMP e FACTOR, conforme descrito por Khattree and Naik (2000). Os gráficos foram elaborados conforme Lipkovich and Smith (2002).

As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS[®] - *Statistical Analysis System* versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA) ao nível de 5% de significância.

Resultados e Discussão

Bactérias

Ambos os grupos de bactérias avaliadas (láticas e *Micrococcaceae*) apresentaram efeito de interação significativo ($p < 0,05$) para $US \times t_p$ e $US \times t_a$. De modo geral, o comportamento de bactérias láticas (*P. pentosaceus* e *P. acidilactici*) (Fig. 1a,b) e das bactérias *Micrococcaceae* (*S. xylosus* e *S. carnosus*) (Fig. 1c,d) seguiram o previsto para salame nas fases de processamento e armazenamento (Hugas e Monfort 1997; Aquilanti et al. 2007; Del Nobile et al. 2009; Spaziani et al. 2009; Aro Aro et al. 2010).

Percebe-se estímulo ao crescimento logo após a exposição ao US (dia zero), tanto para bactérias láticas (Fig 1a) quanto para as *Micrococcaceae* (Fig. 1c). Alguns mecanismos são propostos para este efeito, como a capacidade do US em desaglomerar micro-organismos agrupados e aumentar sua viabilidade (Gao et al. 2014a; Gao et al. 2014b; Barukčić et al. 2015; Joyce et al. 2003), a alteração na permeabilidade e seletividade da membrana celular provocada pela cavitação, com a formação de um poro temporário que favorece a liberação e o transporte de nutrientes e oxigênio (Chisti 2003; Nguyen et al. 2009; Bermúdez-Aguirre et al. 2011), a agitação produzida pela cavitação que auxilia a transportar estas substâncias (Pitt e Ross 2003), a quebra e consequente maior biodisponibilidade de macromoléculas nutritivas (Feng et al. 2008; Alarcon-Rojo et al. 2015) e a hipótese de ser um mecanismo de auto-defesa ao estresse mecânico biótico e abiótico sofrido pelo US (Lin and Wu 2002). Contudo, estes efeitos são temporários, cessando minutos ou horas após a sonicação (Chisti 2003; Yeo e Liong 2011, 2013;). Isto explica porque o estímulo ao crescimento das bactérias láticas e *Micrococcaceae* foi mais perceptível no dia zero, mas pouco notável no restante do processamento e no armazenamento. Nguyen et al. (2009) e Yeo e Liong (2011) observaram redução nas contagens de diferentes bactérias imediatamente após a sonicação e aumento poucas horas depois, conferindo efeito final positivo do US no crescimento dos micro-organismos; porém, os autores acompanharam a viabilidade somente durante algumas horas.

Após 2 dias, as bactérias láticas (Fig. 1a) apresentaram rápido crescimento independentemente do tratamento, em função da fermentação mais intensa que ocorre neste período (Aquilanti et al. 2007). A capacidade reprodutiva não foi alterada pela sonicação, com contagens similares ao controle ou ligeiramente superiores após 6 min e 9 min de exposição para ambos os tipos de bactérias no início da maturação do salame (15 dias, Fig 1a,c). Alliger

(1975) e Yeo e Liong (2013) ressaltaram em seus estudos que micro-organismos sobreviventes à sonicação mantiveram sua aparência microscópica e taxa de reprodução inalterada.

Do 15º dia de processamento até 30 dias de armazenamento (Fig. 1b,d) abrange-se a fase estacionária da curva de crescimento, com número de colônias de bactérias lácticas praticamente inalterado. O efeito do US neste período só é percebido para *Micrococcaceae* na saída da câmara e início do armazenamento com redução $<1 \log \text{ UFC g}^{-1}$ nas amostras sonicadas em comparação ao controle. Este período coincide com o começo da fase de declínio para estas bactérias (Fig. 1d), enquanto que para as bactérias lácticas começa após 30 dias de estocagem (Fig. 1b). A menor taxa de crescimento, especialmente para bactérias lácticas, é diretamente relacionada ao aumento de pH no armazenamento (Fig. 2b) (Spaziani et al. 2009; Aro Aro et al. 2010), confirmado pelos coeficientes de correlação negativos significativos ($p < 0,05$) neste período para pH e as bactérias.

Após 120 dias de armazenamento (Fig. 1b,d), o tratamento de 9 min de exposição ao US apresentou contagens superiores aos demais para ambos tipos de bactérias ($p < 0,05$), mostrando ser o tempo de exposição mais efetivo no estímulo ao crescimento e/ou manutenção da viabilidade neste estudo. O efeito tardio possivelmente se deve à ação do US sobre a quebra de macromoléculas e consequente aumento na disponibilidade de nutrientes (Feng et al. 2008), os quais podem ter sido assimilados somente após um longo período. Outra hipótese é que o US tenha reduzido micro-organismos competitivos ao longo do tempo (Marchesini et al. 2015; Bilek and Turantaş 2013).

É importante salientar que a grande maioria dos trabalhos avalia o efeito do US sobre a microbiologia de alimentos líquidos e durante poucas horas ou dias, dificultando uma discussão mais aprofundada. A suscetibilidade ao US das bactérias usadas neste estudo também não foi avaliada até o momento e impede comparações. Alguns fatores podem ter inibido um efeito mais pronunciado do US sobre a cultura microbiana e o processo fermentativo. Apesar de o salame apresentar cerca de 70% de água no dia zero, a consistência sólida e o calibre de 60 mm provavelmente atenuaram a cavitação e dificultaram atingir o produto como um todo, já que o US pode ser considerado um fenômeno de superfície (Reynolds et al. 1978; McDonnell et al. 2014a; McDonnell et al. 2014b). Gao et al. (2014a) observaram que a bactéria *Enterobacter aerogenes* foi mais sensível à ação do US quando dispersa em água do que em leite pela presença de sólidos neste último. A massa heterogênea do salame também pode ter afetado o resultado, como relatam Sams e Feria (1991), que

atribuem a falta de efeito do US na inativação de bactérias aeróbicas em coxa de frango à irregularidade da superfície da pele, o que teria exercido efeito protetor às bactérias. O elevado teor de gordura do salame pode ter reduzido o efeito do US, conforme concluíram Bermúdez-Aguirre e Barbosa-Cánovas (2008) ao estudarem micro-organismos em leite com diferentes percentuais de gordura. O aparato utilizado pode ter influenciado pela intensidade com que a onda ultrassônica foi transmitida, uma vez que sondas emitem energia de maneira mais direta que banhos ultrassônicos e afetam mais os micro-organismos (Liu et al. 2013). Além destes fatores, é importante considerar as particularidades de cada micro-organismo (formato, tamanho, hidrofobicidade, presença de cápsula) e as condições acústicas (frequência, potência, intensidade, amplitude, tempo de exposição) de cada experimento, uma vez que são apontados como de extrema importância para o efeito final de inativação ou estimulação ao crescimento de micro-organismos (Kwiatkowska et al. 2011; Erriu et al. 2014; Turantaş et al. 2015).

pH

O pH teve efeito significativo ($p < 0.05$) apenas tempo no processamento (t_p) e efeitos isolados de US e no armazenamento (t_a). Isto fica claro ao compararmos a proximidade dos valores de pH das amostras sonicadas com o controle ao longo dos 28 dias de processamento (Fig. 2a), enquanto no armazenamento percebe-se discreta influência do US, além do tempo de estocagem (Fig. 2b).

A acidificação é importante no salame por contribuir diretamente com as características sensoriais de aroma, cor, sabor e textura típicos e também por inibir bactérias patogênicas e indesejáveis (Hugas e Monfort 1997). O comportamento do pH foi o mesmo relatado por outros autores para este produto, tanto no processamento quanto no armazenamento (Del Nobile et al. 2009; Aro Aro et al. 2010; Menegas et al. 2013; Ščetar et al. 2013). A queda brusca de pH após 2 dias de processamento (Fig. 2a) é esperada em decorrência da produção de ácidos orgânicos pelas bactérias lácticas (Terra et al. 2004). Gradualmente ocorreu aumento do pH (Fig 2b), decorrente da maturação que se desenvolve durante o armazenamento, em virtude da liberação de peptídeos, aminoácidos básicos e amônia de reações proteolíticas (Spaziani et al. 2009).

Em nosso trabalho, observamos aumento de pH nas amostras sonicadas após 30 dias e 120 dias de armazenamento (Fig. 2b), especialmente após 9 min de tratamento. Os trabalhos

disponíveis em carnes divergem quanto às consequências do US no pH. Enquanto alguns estudos não observaram nenhuma influência (Stadnik e Dolatowski 2011; Stadnik et al. 2014), outros relataram aumento do pH logo após sonicação (Got et al. 1999; Jayasooriya et al. 2007; Caraveo et al. 2015).

Atividade de água e avaliação instrumental da cor

O uso de US não afetou a atividade de água dos salames durante o processamento ($p>0,05$) e no armazenamento somente após 30 dias ($p<0,05$), quando as amostras sonicadas apresentaram valor significativamente inferior (0,87; 0,88 e 0,89 para 3, 6 e 9 min, respectivamente, $p<0,05$) ao controle (0,91). As médias para os dias 0, 2, 15 e 28 dias de processamento foram 0,97; 0,98; 0,94 e 0,90, respectivamente, sendo iguais para todos os tratamentos. Para 30 dias e 120 dias de armazenamento a média foi 0,89 em ambos e em todos os tratamentos. A secagem acústica vem sendo aplicada na desidratação de alimentos, principalmente frutas (Gamboa-Santos et al. 2014; do Nascimento et al. 2016; Santacatalina et al. 2016; Cruz et al. 2016) e vegetais (Gallego-Juárez et al. 1999; Gamboa-Santos et al. 2014; Gamboa-Santos et al. 2013), mas em equipamentos específicos em que o US é acoplado a um sistema de secagem por ar quente. Além disso, parâmetros como temperatura e velocidade do ar são importantes neste processo (Mulet et al. 2011) e usados em magnitude superior às da câmara usada no processamento de salames, justificando a falta de efeito do US na desidratação do salame.

Na avaliação instrumental de cor (dados não mostrados), as amostras sonicadas e controle apresentaram valores similares de L^* (luminosidade) e b^* (*yellowness*). Por outro lado, o parâmetro a^* (*redness*), importante na avaliação de cor em salames, apresentou tendência das amostras sonicadas serem mais vermelhas. Pohlman et al. (1997a), Jayasooriya et al. (2007), Stadnik e Dolatowski (2011) e McDonnel et al. (2015b) não observaram efeito significativo do US sobre a cor (L^* , a^* e b^*) em carnes, enfatizando a importância de parâmetros acústicos (frequência, potência, intensidade e tempo de exposição) sobre este atributo.

Oxidações lipídica e proteica

As reações oxidativas são importantes no salame por estarem ligadas à formação de aroma e sabor (Hugas e Monfort 1997), além de determinarem diretamente a extensão da vida de prateleira (Ščetar et al. 2013). O US pode afetar a oxidação pela formação de radicais livres e outras espécies reativas durante a sonicação, as quais podem facilmente reagir com compostos oxidáveis (Soria e Villamiel 2010; Kentish e Ashokkumar 2011). Embora tenha sido utilizado antioxidante em nossa formulação, tanto VP quanto TBARS apresentaram efeito de interação significativo ($p < 0,05$) para $US \times t_p$ e $US \times t_a$.

A cinética de oxidação de lipídios costuma apresentar uma fase lag conhecida como indução, seguida de aumento exponencial da taxa de oxidação (fase de propagação) e por fim a decomposição dos compostos formados (fase de terminação) (Damodaran et al. 2010). Observa-se na Fig. 3a,c que o controle se manteve na fase de indução até o 15º dia de processamento, com níveis constantes de produção de compostos primários (peróxidos) e baixa produção de compostos secundários de oxidação (TBARS). Embora as amostras sonicadas não tenham sido afetadas pelo US imediatamente após exposição (dia 0), houve aumento de VP e TBARS no 2º dia de processamento nos salames expostos por mais tempo ao US.

No início da maturação do salame (15 dias), o VP é maior nas amostras sonicadas ($p < 0,05$), quando também houve aumento considerável de TBARS (Fig. 3a,c). Neste ponto, provavelmente as amostras tratadas com US já se encontravam no início da fase de propagação, que começa para o controle somente no final do processamento e início do armazenamento. O auge do VP para o controle ($0,15 \text{ mEq kg}^{-1}$) foi notado após 30 dias de estocagem (Fig. 3b), enquanto os maiores valores para as amostras tratadas com US foram observados já no fim do processamento e início do armazenamento ($0,13$ a $0,14 \text{ mEq kg}^{-1}$). Consequentemente, os valores de TBARS também foram elevados ($1,23$ a $1,57 \text{ mg MDA kg}^{-1}$) em comparação ao controle ($0,97 \text{ mg MDA kg}^{-1}$) (Fig. 3d). Com 30 dias de estocagem, o VP das amostras sonicadas foi inferior ao controle provavelmente por terem atingido a fase de terminação, se decompondo em álcoois, aldeídos, cetonas, alcanos, ésteres e ácidos graxos de cadeia curta (Jahouach-Rabai et al. 2008). Com isto, compostos secundários de oxidação como o MDA ainda mantiveram altas concentrações ($1,11$ a $1,61 \text{ mg MDA kg}^{-1}$, 30 dias, Fig. 3d).

Pela mesma razão, no fim do armazenamento (120 dias) o VP declinou rapidamente. Após algum tempo de armazenamento de salame, também é esperada redução nos valores de TBARS, em virtude do MDA se ligar covalentemente com aminoácidos oriundos de reações proteolíticas (Estévez 2011) ou com nitrito residual (Fuentes et al. 2014), tal como aconteceu com o controle no fim do armazenamento. Neste ponto, os tratamentos com US mantiveram altos valores de TBARS, demonstrando que a oxidação ainda estava ocorrendo nestas amostras. Destaca-se o tempo de 9 min, que apresentou VP significativamente superior aos demais ($0,11 \text{ mEq Kg}^{-1}$, $p < 0,05$) no 120º dia. As três amostras sonicadas também apresentaram valores de TBARS significativamente maiores ($1,35 \text{ mg MDA kg}^{-1}$ – 3 min, $0,97 \text{ mg MDA kg}^{-1}$ – 6 min, $1,55 \text{ mg MDA kg}^{-1}$ – 9 min) que o controle ($0,69 \text{ mg MDA kg}^{-1}$, $p < 0,05$) neste período.

Os VP obtidos ao longo deste experimento estão abaixo do limite considerado aceitável para salames ($2 - 4 \text{ mEq kg}^{-1}$ gordura, correspondente a $\sim 0,6 \text{ mEq kg}^{-1}$ amostra) (Chizzolini et al. 1998) e inferiores aos relatados para salame armazenado nas mesmas condições (Ščetar et al. 2013). Por outro lado, os valores de TBARS foram mais elevados que os encontrados por Del Nobile et al. (2008), Olivares et al. (2011) e Fuentes et al. (2014). Não há consenso para os valores apontados como limite para detecção de odor desagradável; enquanto Chizzolini et al. (1998) recomendam $0,3 \text{ mg MDA kg}^{-1}$, Candogan and Kolsarici (2003) apontam 1 mg MDA kg^{-1} e Connell (1990) 2 mg MDA kg^{-1} de amostra.

Embora tenha sido relatado que efeitos sonoquímicos na oxidação sejam evidentes somente em frequências maiores ($> 200 \text{ kHz}$) por formar maior número de bolhas ativas (Juliano et al. 2014), alguns trabalhos notaram aceleração da oxidação lipídica ao usar US em frequências próximas à deste estudo. Chemat et al. (2004) relataram a formação de compostos voláteis ligados à oxidação e aumento substancial de peróxidos ao usar US (20 kHz) no processamento de óleo de girassol, sendo a concentração destes compostos diretamente relacionada ao tempo de exposição. Chang e Wong (2012) também notaram que o aumento no tempo de sonicação (60 kHz , 0 a 90 min) aumentou os valores de TBARS em peixe cobia (*Rachycentron canadum*). Jahouach-Rabai et al. (2008), Marchesini et al. (2012) e Torkamani et al. (2014) do mesmo modo descreveram importante relação do tempo de sonicação com o aumento da oxidação lipídica em azeite de oliva, leite e soro de leite, respectivamente.

A formação de radicais livres e outras espécies reativas pelo US também pode afetar a oxidação de proteínas por induzir a formação de ligações cruzadas dissulfeto (Soria e Vilamiel, 2010). Com isso, a concentração de tiois livres / grupos SH diminui, como ocorreu

ao longo da etapa de processamento (Fig. 4a). Os termos US e t_p tiveram efeitos significativos isolados no processamento ($p < 0,05$) e interação significativa $US \times t_a$ ($p < 0,05$) no armazenamento. A redução gradual de tiois na primeira etapa pode ter sido devido à intensa proteólise que ocorre neste período, que facilita o acesso de radicais reativos aos aminoácidos. Além disso, Berardo et al. (2015) mostraram que em salames com pH 4,8 (próximo ao observado até o 15º dia de processamento) a quantidade de tiois livres é menor que em pH 5,2. Em nosso estudo, o pH atingiu em torno de 5,2 com 30 dias de armazenamento, quando a concentração de tiois aumentou consideravelmente. Esta relação foi confirmada pela correlação positiva significativa ($p < 0,001$) entre tiois e pH tanto no processamento quanto no armazenamento.

Durante a etapa de processamento, somente US foi significativo ($p < 0,05$) (médias 80,2; 87,3; 86,4 e 90,0 $\mu\text{mol tiol mg proteína}^{-1}$ para 0, 3, 6 e 9 min, respectivamente), sendo a média do tempo 9 min significativamente superior às demais ($p < 0,05$). Possivelmente o maior tempo de exposição ao US tenha promovido maior desnaturação (Pohlman et al. 1997a,b), e ter exposto grupos SH livres do interior da proteína (Grossi et al., 2014). Chandrapala et al. (2011) e Arzeni et al. (2012) não observaram efeito significativo do uso de US ao avaliarem o teor de tiois em albumina e em proteínas concentradas de soro (sonda 20 kHz, 1 a 60 min), soja e ovo (sonda 20 kHz, 20 min) logo após sonicação.

O efeito do US foi mais pronunciado após 30 dias de armazenamento (Fig. 4b), quando a quantidade de tiol aumentou bruscamente e as amostras sonicadas apresentaram valores significativamente maiores (250, 225 e 270 $\mu\text{mol tiol mg proteína}^{-1}$ para 3, 6 e 9 min US, respectivamente) que o controle (184 $\mu\text{mol tiol mg proteína}^{-1}$, $p < 0,05$). Após 120 dias de armazenamento, os valores voltaram a cair, sem diferença entre as amostras ($p > 0,05$). Grossi et al. (2014) usaram alta pressão como tecnologia emergente em *semitendinosus* suíno e do mesmo modo observaram queda inicial de tiois nos primeiros dias de armazenamento refrigerado (2 °C), com aumento após 6 semanas e redução após 8 semanas. Os autores sugerem que depois de algum tempo grupos SH localizados no interior da proteína podem ser expostos ou enzimas antioxidantes podem retomar sua atividade. Neste sentido, o US pode ter exercido maior efeito nestes mecanismos, comparado ao controle.

Poucos trabalhos avaliam a oxidação proteica em produtos cárneos fermentados (Berardo et al. 2015) e principalmente por tiois livres, necessitando mais estudos que esclareçam seu mecanismo nestes produtos em que a vida de prateleira é longa e estão sob exposição de fatores pró-oxidantes como luz e temperatura ambiente durante seu

armazenamento. Uma vez oxidadas, as propriedades físicas e químicas das proteínas podem ser alteradas, incluindo solubilidade, suscetibilidade à proteólise, atividade enzimática e capacidade de retenção de água (Estévez 2011; Zhang et al. 2013), e assim afetariam a qualidade do salame.

Pigmentos heme totais, ferro não heme e metamioglobina

Em produtos cárneos, o ferro assume grande importância por fazer parte dos pigmentos hemoglobina (Hb) e mioglobina (Mb), sendo esta última responsável por mais de 90% da coloração da carne e por isso de maior importância. O grupo prostético heme da Mb contém um anel de porfirina (hematina) que tem em seu centro um átomo de ferro. Este ferro pode ser encontrado na forma reduzida (Fe^{2+}) ou oxidada (Fe^{3+}), e quando na forma reduzida permite a ligação de pequenas moléculas (O_2 , CO_2 , CO, NO). Dependendo do estado de oxidação e do ligante, pode formar derivados químicos de colorações e estabilidades diversas, estando diretamente relacionado à coloração dos produtos (Faustman et al. 2010; Gomide et al. 2013). O ferro reduzido está relacionado com a cor vermelha em produtos curados fermentados, que se forma com a ligação ao óxido nítrico formando principalmente o complexo nitrosomioglobina (NOMB) (Hammes 2012). Em algumas condições, como pH ácido, aquecimento, desnaturação, longos tempos de estocagem e presença de sal e H_2O_2 , este ferro pode ser liberado do grupamento heme, sendo referido como ferro não heme (Ahn et al. 1993).

Em nosso estudo, determinamos o teor de pigmentos heme totais (PHT), ferro não heme (FeNH), e metamioglobina (MMb). PHT e FeNH apresentaram interação significativa ($p < 0,05$) entre $US \times t_p$ e $US \times t_a$, enquanto MMb teve efeitos significativos isolados dos termos US e t_p durante o processamento e somente de t_a na etapa de armazenamento ($p < 0,05$).

Na Fig. 5a percebe-se que a sonicação reduziu o teor de PHT no dia 0, provavelmente em função da desnaturação que o US provoca logo após sua aplicação (Pohlman et al. 1997a,b). No entanto, ao final do processamento e até o fim da vida de prateleira (Fig. 5b) ocorreu o inverso, as amostras sonicadas (especialmente por 6 min e 9 min) apresentaram maiores teores de PHT, refletindo diretamente na maior tonalidade avermelhada (maior a^* , dados não mostrados) em comparação ao controle. No período de armazenamento houve correlação positiva ($p < 0,001$) entre PHT e bactérias *Micrococcaceae*, as quais auxiliam na

manutenção da cor vermelha (Hugas e Monfort, 1997) e tiveram sua viabilidade afetada positivamente pelo US. Estas bactérias possuem enzima nitrato redutase, que auxilia na redução do nitrato a nitrito no processo de formação da NOMb (Terra et al. 2003). Gimeno et al. (2001) descreveram a mesma relação entre PHT e *Micrococcaceae* em salames. Ao mesmo tempo, houve correlação negativa ($p < 0,0001$) entre PHT e MMb. Deste modo, o US pode contribuir para coloração vermelha característica de salames durante a etapa de exposição do produto ao consumidor.

Apesar de os PHT terem reduzido nas amostras sonicadas logo após exposição e das condições favoráveis à liberação do ferro da Mb com o uso de US (desnaturação, cavitação, aumento da concentração de radicais reativos), isso não refletiu no aumento de FeNH no dia 0 (Fig. 6a). No entanto, no 2º dia de processamento, o FeNH nas amostras tratadas com US foi consideravelmente maior (0,47 a 0,61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) que o controle (0,34 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), provavelmente devido ao pH ácido decorrente da fermentação. Tanto no processamento quanto no armazenamento o FeNH apresentou correlação negativa ($p < 0,05$) com pH, confirmando que o pH ácido auxilia na liberação do ferro por desnaturar a fração proteica dos pigmentos (Rhee and Ziprin 1987; Ahn et al. 1993). Ao longo do processamento os teores de FeNH aumentaram gradualmente para todas as amostras, acredita-se que em virtude de algumas condições desta etapa, como pH baixo, desnaturação, temperatura da câmara, uso de sal na formulação e alta velocidade das reações microbianas e oxidativas. Diferentemente do relatado em carnes bovina e de cordeiro (Purchas et al. 2003), peixes (Chaijan et al. 2005) e presunto (Li et al. 2012), que descreveram aumento de FeNH durante a estocagem, em nosso experimento a concentração de FeNH reduziu após 30 dias e 120 dias de armazenamento. Contudo, o período de avaliação dos trabalhos citados foi inferior ao nosso e não foram encontrados trabalhos que avaliassem o comportamento de FeNH no armazenamento de salame.

Com relação ao pigmento oxidado MMb (Fig. 7), na etapa de processamento houve influência da sonicação (US $p < 0,05$), quando os valores foram, em média, ligeiramente superiores (77,2%; 74,3%; 74,7% para 3, 6 e 9 min, respectivamente) ao controle (74%). Isto pode ter sido provocado pela maior quantidade de radicais livres produzidos pelo US que podem ter atuado como oxidantes da Mb. A formação de MMb foi associada com a redução no parâmetro de cor b^* (*yellowness*) em salames (Pérez-Alvarez et al. 1999; Bedia et al. 2011) e comprovado em nosso estudo pela correlação negativa ($p < 0,0001$) entre MMb e b^* no processamento (dados não mostrados). No 2º dia nota-se aumento de MMb em todas as

amostras, provavelmente pelas condições oxidantes de menor pH, sendo que no processamento houve correlação negativa ($p < 0,0001$) entre MMb e pH. Nesta etapa, a secagem e a elevada concentração de sal também podem ter contribuído para a formação da MMb (Pérez-Alvarez et al. 1999). Os valores mantiveram-se praticamente constantes no armazenamento (Fig. 7b), quando houve somente efeito do tempo (t_a , $p < 0,05$).

A importância da determinação de FeNH e MMb consiste no fato de possuírem reconhecida atividade pró-oxidante em lipídios e proteínas, ao mesmo tempo em que produtos da oxidação lipídica favorecem a oxidação dos PHT com formação de MMb (Rhee and Ziprin 1987; Carlsen et al. 2005; Grunwald and Richards 2006; Chaijan 2008; Faustman et al. 2010). FeNH teve correlação positiva significativa ($p < 0,0001$) com peróxidos e TBARS no processamento e correlação negativa ($p < 0,0001$) com tiol tanto no processamento quanto no armazenamento. MMb teve correlações com as oxidações somente no processamento (positiva com peróxidos e TBARS e negativa com tiois, $p < 0,0001$). Deste modo, FeNH e MMb contribuíram expressivamente com as reações oxidativas lipídicas e proteicas ocorridas no salame, assim como os produtos da oxidação lipídica podem ter contribuído para aumentar a concentração de MMb (Faustman et al. 2010).

Perfil de Textura (TPA)

Os resultados de coesividade, flexibilidade, mastigabilidade e dureza dos salames constam na Tabela 1. Nenhum dos parâmetros avaliados foi afetado significativamente pelo US ($p > 0,05$). Apesar de não haver diferença estatística, percebe-se claramente tendência a menor dureza nas amostras sonicadas, sendo que o tratamento de 3 min apresentou aproximadamente a metade do valor (54,5 N) do controle (100,2 N). A dureza é diretamente relacionada à maciez, sendo esta considerada um atributo positivo em algumas variedades de embutidos, enquanto em outros a textura macia é um tipo de defeito (Spaziani et al. 2009). No caso do salame tipo Italiano, consistência demasiadamente macia pode ser associada a um produto que ainda não está pronto para consumo, enquanto a dureza excessiva pode remeter a um produto ressecado. Do mesmo modo, para o parâmetro de mastigabilidade nota-se que as amostras sonicadas tiveram valores menores que o controle. Dureza e mastigabilidade são derivados da proteólise e da capacidade de retenção de água (Buettner e Schieberle 2000), fenômenos que são suscetíveis à influência do US (Stadnik et al. 2008; Stadnik e Dolatowski 2011; Stadnik et al. 2014; Alarcón-Rojo et al. 2015; Turantaş et al. 2015).

Trabalhos que avaliaram o perfil de textura não observaram efeito do US em carne suína (McDonnel et al. 2014b) e em salsichas (Cichoski et al. 2015), enquanto Siró et al. (2009) descreveram redução do parâmetro dureza ao usar US em carne suína. Os mecanismos associados aos efeitos positivos são relacionados à quebra da integridade muscular e promoção de reações enzimáticas, proporcionados pela cavitação (Got et al., 1999; Chemat, Zill-e-Huma e Khan, 2011; Chandrapala et al., 2012).

Análise discriminatória canônica

Para complementar a discussão dos resultados, foram produzidos os gráficos da análise discriminatória canônica para as etapas de processamento (Fig 8a) e armazenamento (Fig 8b). As variáveis que não contribuíram para explicar o modelo foram excluídas do gráfico.

Em ambas as etapas percebemos a formação de grupos, os quais foram separados de acordo com o dia de análise. No processamento, a análise das duas dimensões juntas explica 91,5% da variação dos dados, sendo a primeira função responsável pela maior parte da variação (71,2%). O grupo do dia zero foi associado a maiores valores de pH, parâmetro de cor b^* e, em menor proporção, a elevados valores de tiol, o que era esperado no início do processamento do salame. Percebe-se a relação inversa (ângulo entre vetores $\sim 180^\circ$) para b^* e metamioglobina, e entre pH e as bactérias lácticas, conforme discutido anteriormente. O grupo do dia 2 foi separado dos demais principalmente pelos maiores valores de luminosidade (L^* , dados não mostrados), enquanto o grupo do dia 15 foi relacionado a maiores valores de bactérias lácticas e metamioglobina. No 2º dia de processamento, as contagens de bactérias lácticas também foram elevadas em decorrência da fermentação e por isso o grupo do dia 2 ficou próximo ao vetor das bactérias lácticas. O grupo do dia 28 foi formado pelos altos valores observados nas medidas de oxidação lipídica neste período (Fig 3). Este gráfico mostra a estreita correlação entre TBARS e peróxidos, assim como a relação inversa entre estas medidas e a quantificação de tiol. O vetor do ferro não heme ficou localizado próximo aos de TBARS, peróxidos e metamioglobina e a $\sim 180^\circ$ do tiol, confirmando seu efeito de pró-oxidante.

No armazenamento (Fig. 8b), 84,4% da variação dos dados pode ser explicada pelo gráfico, com 60,7% da variação atribuída à primeira função. O grupo do dia 1 foi associado aos maiores valores de atividade de água e ferro não heme observados no início do

armazenamento. Com 30 dias de armazenamento, altos valores de tiol e ferro heme foram encontrados, contribuindo para separar este grupo dos demais. Nestes primeiros pontos do armazenamento (1 e 30 dias), o controle ficou ligeiramente afastado das demais amostras sonicadas em cada grupo. Ao final do armazenamento (120 dias), foram observados os maiores valores de pH e metamioglobina, sendo estes os principais fatores que contribuíram para formação deste grupo. Neste gráfico, novamente percebe-se o efeito pró-oxidante do ferro não heme ($\sim 180^\circ$ do vetor do tiol) e a relação inversa do pH com a viabilidade de bactérias lácticas e *Micrococcaceae*.

Conclusão

No presente estudo, diferentes tempos de sonicação (0, 3, 6 e 9 min) foram usados para verificar o efeito sobre características de salame tipo Italiano durante a etapa de processamento e de armazenamento do produto. De acordo com nossos resultados, verificamos que o US modificou a curva de crescimento das bactérias estudadas, estimulando o crescimento em alguns pontos e inibindo em outros. Contudo, estas alterações não afetaram o pH e o processo fermentativo. O tratamento por 9 min mostrou ser o mais efetivo para estimular o crescimento, possivelmente por ser o de maior tempo de exposição.

O uso de US também não influenciou na desidratação do salame e em parâmetros de cor de luminosidade (L^*) e tonalidade azul-amarelo (b^*), mas pode ter auxiliado na tonalidade vermelha (a^*) pelo aumento de pigmentos heme totais, especialmente na etapa de armazenamento.

As reações oxidativas lipídicas e proteicas foram aceleradas com a sonicação, no entanto foram mantidas dentro de limites aceitáveis. Verificamos que fatores pró-oxidantes como ferro não heme e metamioglobina afetaram as reações oxidativas e vice-versa. Em nosso estudo, visualizamos possibilidade do US influenciar positivamente a textura do salame, mas são necessárias avaliações do perfil de textura em mais pontos do armazenamento.

A análise discriminatória canônica separou as amostras em grupos de acordo com o dia de análise. Isto pode ter ocorrido tanto em função do efeito preponderante do tempo de processamento/armazenamento nas características do salame, uma vez que este produto passa

por mudanças significativas ao longo do tempo, quanto por falta de efeito expressivo do tempo de sonicação.

De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que estima as implicações do uso do US no processamento de salame e, sendo assim, necessitam-se mais estudos que avaliem suas potencialidades sobre o produto antes de ser aplicado na indústria. Ainda assim, percebe-se que o uso do US neste produto apresenta características a serem melhor exploradas, principalmente com relação aos pigmentos heme e à textura.

Agradecimentos

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Referências

- Ahn DU, Wolfe FH & Sim JS (1993) Three Methods for Determining Nonheme Iron in Turkey Meat. *Journal of Food Science*, 58(2), 288-291.
- Alarcon-Rojo AD, Janacua H, Rodriguez JC, Paniwnyk L & Mason TJ (2015) Power ultrasound in meat processing. *Meat Science*, 107, 86-93.
- Alliger H (1975) Ultrasonic disruption. *American Laboratory*, 10(1), 75-85.
- Alves LdL, Cichoski AJ, Barin JS, Rampeloto C & Durante EC (2013) O ultrassom no amaciamento de carnes. *Ciência Rural*, 43(8), 1522-1528.
- Aquilanti L, Santarelli S, Silvestri G, Osimani A, Petruzzelli A & Clementi F (2007) The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 136-145.
- Aro Aro JM, Nyam-Osor P, Tsuji K, Shimada K-i, Fukushima M & Sekikawa M (2010) The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. *Food Chemistry*, 119(1), 279-285.
- Arzeni C, Pérez OE & Pilosof AMR (2012) Functionality of egg white proteins as affected by high intensity ultrasound. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 308-316.

- Ashokkumar M (2015) Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25, 17-23.
- Awad TS, Moharram HA, Shaltout OE, Asker D & Youssef MM (2012) Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410-427.
- Barukčić I, Lisak Jakopović K, Herceg Z, Karlović S & Božanić R (2015) Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 94-101.
- Bedia M, Méndez L & Bañón S (2011) Evaluation of different starter cultures (Staphylococci plus Lactic Acid Bacteria) in semi-ripened Salami stuffed in swine gut. *Meat Science*, 87(4), 381-386.
- Berardo A, Claeys E, Vossen E, Leroy F & De Smet S (2015) Protein oxidation affects proteolysis in a meat model system. *Meat Science*, 106, 78-84.
- Bermúdez-Aguirre D & Barbosa-Cánovas GV (2008) Study of butter fat content in milk on the inactivation of *Listeria innocua* ATCC 51742 by thermo-sonication. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 176-185.
- Bermúdez-Aguirre D, Mobbs T & Barbosa-Cánovas GV (2011) *Ultrasound Applications in Food Processing*. In: Feng H, Barbosa-Cánovas GV & Weiss J (eds) *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. pp 678. Springer, New York.
- Bilek SE & Turantaş F (2013) Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 155-162.
- Bourne MC (1978) Texture profile analysis. *Food Technology*, 32(1), 62-66.
- Brasil (2000) Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabres, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburgues, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Linguiça Colonial e Pepperoni. In: Ministério da Agricultura PeA (ed), vol Instrução Normativa nº 22. vol 15, 03/08/2000 edn. pp 15-28. *Diário Oficial da União*, Brasília.
- Buettner A & Schieberle P (2000) Influence of mastication on the concentrations of aroma volatiles — some aspects of flavour release and flavour perception. *Food Chemistry*, 71(3), 347-354.
- Candogan K & Kolsarici N (2003) Storage stability of low-fat beef frankfurters formulated with carrageenan or carrageenan with pectin. *Meat Science*, 64(2), 207-214.
- Caraveo O, Alarcon-Rojo AD, Renteria A, Santellano E & Paniwnyk L (2015) Physicochemical and microbiological characteristics of beef treated with high-

- intensity ultrasound and stored at 4 °C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), 2487-2493.
- Cárcel JA, García-Pérez JV, Benedito J & Mulet A (2012) Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*. 110(2), 200-207.
- Carlsen CU, Møller JKS & Skibsted LH (2005) Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews*, 249(3-4), 485-498.
- Chaijan M (2008) Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30(1), 47-53.
- Chaijan M, Benjakul S, Visessanguan W & Faustman C (2005) Changes of pigments and color in sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during iced storage. *Food Chemistry*, 93(4), 607-617.
- Chandrapala J, Oliver C, Kentish S & Ashokkumar M (2012) Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(5), 975-983.
- Chandrapala J, Zisu B, Palmer M, Kentish S & Ashokkumar M (2011) Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- Chang H-c & Wong R-x (2012) Textural and biochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) sashimi tenderised with the ultrasonic water bath. *Food Chemistry*, 132(3), 1340-1345.
- Chemat F, Grondin I, Costes P, Moutoussamy L, Sing ASC & Smadja J (2004) High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(5), 281-285.
- Chemat F, Zill e H & Khan MK (2011) Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.
- Chisti Y (2003) Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. *Trends in Biotechnology*, 21(2), 89-93.
- Chizzolini R, Novelli E & Zanardi E (1998) Oxidation in traditional mediterranean meat products. *Meat Science*, 49, Supplement 1, S87-S99.
- Cichoski AJ, Rampelotto C, Silva MS, de Moura HC, Terra NN, Wagner R, de Menezes CR, Flores EMM & Barin JS (2015) Ultrasound-assisted post-packaging pasteurization of sausages. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30, 132-137.
- Cichoski AJ, Zis LC & Franceschetto C (2009) Características físico-químicas e microbiológicas da superfície do salame tipo italiano contendo solução de lactato de potássio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(3), 546-552.
- Commission Internationale de l'Éclairage C (1976) *Colorimetry*. In: Publication n° 15, vol 15. Bureau Central de la CIE, Viena.

- Connell JJ (1990) Methods of assessing and selecting for quality. In: Connell JJ (ed) *Control of fish quality*. 3^a edn. Springer: Berlin.
- Costa MGM, Fonteles TV, de Jesus ALT & Rodrigues S (2013) Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*, 139(1-4), 261-266.
- Cruz L, Clemente G, Mulet A, Ahmad-Qasem MH, Barrajon-Catalan E & Garcia-Perez JV (2016) Air-borne ultrasonic application in the drying of grape skin: Kinetic and quality considerations. *Journal of Food Engineering*, 168, 251-258.
- Dalla Santa OR (2008) Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de Salame Tipo Italiano. Food Technology, Federal University of Parana, Curitiba.
- Damodaran S, Parkin KL & Fennema OR (2010) *Química de Alimentos de Fennema*. 4 edn. Artmed: Porto Alegre.
- Del Nobile MA, Conte A, Incoronato AL, Panza O, Sevi A & Marino R (2009) New strategies for reducing the pork back-fat content in typical Italian salami. *Meat Science*, 81(1), 263-269.
- do Nascimento EMGC, Mulet A, Ascheri JLR, de Carvalho CWP & Cárcel JA (2016) Effects of high-intensity ultrasound on drying kinetics and antioxidant properties of passion fruit peel. *Journal of Food Engineering*, 170, 108-118.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82(1), 70-77.
- Erriu M, Blus C, Szmukler-Moncler S, Buogo S, Levi R, Barbato G, Madonnaripa D, Denotti G, Piras V & Orrù G (2014) Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 15-22.
- Estévez M (2011) Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, 89(3), 259-279.
- Faustman C, Sun Q, Mancini R & Suman SP (2010) Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, 86(1), 86-94.
- Feng H, Yang W & Hielscher T (2008) Power ultrasound. *Food Science and Technology International*, 14(5), 433-436.
- Fuentes V, Estévez M, Ventanas J & Ventanas S (2014) Impact of lipid content and composition on lipid oxidation and protein carbonylation in experimental fermented sausages. *Food Chemistry*, 147, 70-77.
- Gallego-Juárez JA, Rodríguez-Corral G, Gálvez-Moraleda JC & Yang TS (1999) A new high intensity ultrasonic technology for food dehydration. *Drying Technology*, 17, 597-608.
- Gamboa-Santos J, Montilla A, Soria AC, Cárcel JA, García-Pérez JV & Villamiel M (2014) Impact of power ultrasound on chemical and physicochemical quality indicators of strawberries dried by convection. *Food Chemistry*, 161, 40-46.

- Gamboa-Santos J, Soria AC, Villamiel M & Montilla A (2013) Quality parameters in convective dehydrated carrots blanched by ultrasound and conventional treatment. *Food Chemistry*, 141(1), 616-624.
- Gao S, Hemar Y, Lewis GD & Ashokkumar M (2014a) Inactivation of *Enterobacter aerogenes* in reconstituted skim milk by high- and low-frequency ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2099-2106.
- Gao S, Lewis GD, Ashokkumar M & Hemar Y (2014b) Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 446-453.
- Gimeno O, Astiasarán I & Bello J (2001) Calcium ascorbate as a potential partial substitute for NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygienic quality at different concentrations. *Meat Science*, 57(1), 23-29.
- Gomide LAdM, Ramos EM & Fontes PR (2013) *Ciência e Qualidade da Carne: Fundamentos*. UFV: Viçosa.
- Got F, Culioli J, Berge P, Vignon X, Astruc T, Quideau JM & Lethiecq M (1999) Effects of high-intensity high-frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physico-chemical properties of beef. *Meat Science*, 51(1), 35-42.
- Grossi A, Bolumar T, Søltoft-Jensen J & Orlien V (2014) High pressure treatment of brine enhanced pork semitendinosus: Effect on microbial stability, drip loss, lipid and protein oxidation, and sensory properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 11-21.
- Grunwald EW & Richards MP (2006) Mechanisms of Heme Protein-Mediated Lipid Oxidation Using Hemoglobin and Myoglobin Variants in Raw and Heated Washed Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8271-8280.
- Hammes WP (2012) Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology*, 29(2), 151-156.
- Hornsey HC (1956) The colour of cooked cured pork. I.—Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 7(8), 534-540.
- Hugas M & Monfort JM (1997) Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, 59(4), 547-554.
- Jahouach-Rabai W, Trabelsi M, Van Hoed V, Adams A, Verhé R, De Kimpe N & Frikha MH (2008) Influence of bleaching by ultrasound on fatty acids and minor compounds of olive oil. Qualitative and quantitative analysis of volatile compounds (by SPME coupled to GC/MS). *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4), 590-597.
- Jayasooriya SD, Torley PJ, D'Arcy BR & Bhandari BR (2007) Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine Semitendinosus and Longissimus muscles. *Meat Science*, 75(4), 628-639.

- Joyce E, Phull SS, Lorimer JP & Mason TJ (2003) The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(6), 315-318.
- Juliano P, Torkamani AE, Leong T, Kolb V, Watkins P, Ajlouni S & Singh TK (2014) Lipid oxidation volatiles absent in milk after selected ultrasound processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2165-2175.
- Kentish S & Ashokkumar M (2011) The physical and chemical effects of ultrasound. In: Feng H, Barbosa-cánovas gv & Weiss J (Eds) *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*. 1 edn. (pp 1-13). CRC Press: New York.
- Khattree R & Naik DN (2000) *Multivariate data reduction and discrimination with SAS Software*. SAS Institute, Cary
- Koda S, Kimura T, Kondo T & Mitome H (2003) A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system. *Ultrasonics Sonochemistry*, 10(3), 149-156.
- Krzywicki K (1982) The determination of haem pigments in meat. *Meat Science*, 7(1), 29-36.
- Kwiatkowska B, Bennett J, Akunna J, Walker GM & Bremner DH (2011) Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*, 29(6), 768-780.
- Li H, Li CB, Xu XL & Zhou GH (2012) Effects of illumination and packaging on non-heme iron and color attributes of sliced ham. *Meat Science*, 91(4), 521-526.
- Lin L & Wu J (2002) Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. *Biotechnology and Bioengineering*, 78(1), 81-88.
- Lipkovich I & Smith EP (2002) Biplot and singular value decomposition macros for Excel. *Journal of Statistical Software*, 7(5), 1-15.
- Liu D, Zeng X-A, Sun D-W & Han Z (2013) Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 18, 132-137.
- Lutz I-IA (2008) *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4 edn. Instituto Adolfo Lutz: São Paulo.
- Marchesini G, Balzan S, Montemurro F, Fasolato L, Andrighetto I, Segato S & Novelli E (2012) Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 391-397.
- Marchesini G, Fasolato L, Novelli E, Balzan S, Contiero B, Montemurro F, Andrighetto I & Segato S (2015) Ultrasonic inactivation of microorganisms: A compromise between lethal capacity and sensory quality of milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 215-221.

- Mason TJ, Paniwnyk L & Lorimer JP (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3), S253-S260.
- Matsuura K, Hirotsune M, Nunowawa Y, Satoh M & Honda K (1994) Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77(1), 36-40.
- McDonnell CK, Lyng JG & Allen P (2014a) The use of power ultrasound for accelerating the curing of pork. *Meat Science*, 98(2), 142-149.
- McDonnell CK, Lyng JG, Arimi JM & Allen P (2014b) The acceleration of pork curing by power ultrasound: A pilot-scale production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 191-198.
- Menegas LZ, Pimentel TC, Garcia S & Prudencio SH (2013) Dry-fermented chicken sausage produced with inulin and corn oil: Physicochemical, microbiological, and textural characteristics and acceptability during storage. *Meat Science*, 93(3), 501-506.
- Mulet A, Cárcel JA, García-Pérez JV & Riera E (2011) Ultrasound-Assisted Hot Air Drying of Foods. In: Feng H, Barbosa-Cánovas GV & Weiss J (Eds) *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. (pp 678). Springer: New York.
- Nguyen TMP, Lee YK & Zhou W (2009) Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by highintensity ultrasound. *International Dairy Journal*, 19(6-7), 410-416.
- Nguyen TMP, Lee YK & Zhou W (2012) Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. *Food Chemistry*, 130(4), 866-874.
- Olivares A, Navarro JL & Flores M (2011) Effect of fat content on aroma generation during processing of dry fermented sausages. *Meat Science*, 87(3), 264-273.
- Pérez-Alvarez JA, Sayas-Barberá MaE, Fernández-López J & Aranda-Catalá V (1999) Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Research International*, 32(9), 599-607.
- Pitt WG & Ross SA (2003) Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnol Prog*, 19(3), 1038-1044.
- Piyasena P, Mohareb E & McKellar RC (2003) Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207-216.
- Pohlman FW, Dikeman ME & Kropf DH (1997a) Effects of high intensity ultrasound treatment, storage time and cooking method on shear, sensory, instrumental color and cooking properties of packaged and unpackaged beef pectoralis muscle. *Meat Science*, 46(1), 89-100.
- Pohlman FW, Dikeman ME & Zayas JF (1997b) The effect of low-intensity ultrasound treatment on shear properties, color stability and shelf-life of vacuum-packaged beef semitendinosus and biceps femoris muscles. *Meat Science*, 45(3), 329-337.

- Puhl SS & Mason TJ (2001) The uses of ultrasound for biological decontamination. In: Mason TJJ, Andreas (Ed) *Advances in Sonochemistry*, vol 6. 1 edn. (pp 1-24). Elsevier Sciences B.V.:Amsterdam.
- Purchas RW, Simcock DC, Knight TW & Wilkinson BHP (2003) Variation in the form of iron in beef and lamb meat and losses of iron during cooking and storage. *International Journal of Food Science & Technology*, 38(7), 827-837.
- Raharjo S, Sofos JN & Schmidt GR (1992) Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), 2182-2185.
- Reynolds JB, Anderson DB, Schmidt GR, Theno DM & Siegel DG (1978) Effects of ultrasonic treatment on binding strength in cured ham rolls. *Journal of Food Science*, 43(3), 866-869.
- Rhee KS & Ziprin YA (1987) Lipid oxidation in retail beef, pork and chicken muscles as affected by concentrations of heme pigments and nonheme iron and microsomal enzymic lipid peroxidation activity. *Journal of Food Biochemistry*, 11(1), 11-15.
- Sakakibara M, Wang D, Ikeda K & Suzuki K (1994) Effect of ultrasonic irradiation on production of fermented milk with *Lactobacillus delbrueckii*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2), S107-S110.
- Sams AR & Feria R (1991) Microbial Effects of Ultrasonication of Broiler Drumstick Skin. *Journal of Food Science*, 56(1), 247-248.
- Santacatalina JV, Contreras M, Simal S, Cárcel JA & Garcia-Perez JV (2016) Impact of applied ultrasonic power on the low temperature drying of apple. *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, 100-109.
- Ščetar M, Kovačić E, Kurek M & Galić K (2013) Shelf life of packaged sliced dry fermented sausage under different temperature. *Meat Science*, 93(4), 802-809.
- Shanta NL & Decker EA (1994) Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424.
- Siró I, Vén C, Balla C, Jónás G, Zeke I & Friedrich L (2009) Application of an ultrasonic assisted curing technique for improving the diffusion of sodium chloride in porcine meat. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 353-362.
- Soria AC & Villamiel M (2010) Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331.
- Spaziani M, Torre MD & Stecchini ML (2009) Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Science*, 81(1), 77-85.

- Stadnik J & Dolatowski Z (2011) Influence of sonication on Warner-Bratzler shear force, colour and myoglobin of beef (m. semimembranosus). *European Food Research and Technology*, 233(4), 553-559.
- Stadnik J & Dolatowski ZJ (2008) Influence of sonication on the oxidative stability of beef In: *International Conference of Meat Science and Technology*. (pp 1-3). ICoMST, International Conference of Meat Science and Technology.
- Stadnik J, Dolatowski ZJ & Baranowska HM (2008) Effect of ultrasound treatment on water holding properties and microstructure of beef (m. semimembranosus) during ageing. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2151-2158.
- Stadnik J, Stasiak DM & Dolatowski ZJ (2014) Proteolysis in dry-aged loins manufactured with sonicated pork and inoculated with *Lactobacillus casei* LOCK 0900 probiotic strain. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(12), 2578-2584.
- Stahnke LH (1995) Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels - Part I. Chemical and bacteriological data. *Meat Science*, 41(2), 179-191.
- Suslick KS (1989) The Chemical Effects of Ultrasound. *Scientific American*, 80-86.
- Terra A, Fries LL & Terra NN (2004) *Particularidades na fabricação do salame*. Editora Varela: São Paulo.
- Terra NN (2001) *Apontamentos de tecnologia de carnes*. Editora Unisinos: São Leopoldo.
- Torkamani AE, Juliano P, Ajlouni S & Singh TK (2014) Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 951-957.
- Turantaş F, Kılıç GB & Kılıç B (2015) Ultrasound in the meat industry: General applications and decontamination efficiency. *International Journal of Food Microbiology*, 198, 59-69.
- Wang B, Pace RD, Dessai AP, Bovell-Benjamin A & Phillips B (2002) Modified Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values in Meat with Increased Specificity and Simplicity. *Journal of Food Science*, 67(8), 2833-2836.
- Wang D & Sakakibara M (1997) Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4(3), 255-261.
- Wu H, Hulbert GJ & Mount JR (2000) Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(3), 211-218.
- Yeo S-K & Liong M-T (2013) Effect of ultrasound on bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent organisms and subsequent passages of *Lactobacillus*. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 289-295.

Yeo SK & Liong MT (2011) Effect of ultrasound on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic-supplemented soymilk. *J Agricultural Food Chemistry*, 59(3), 885-897.

Zhang W, Xiao S & Ahn DU (2013) Protein Oxidation: Basic Principles and Implications for Meat Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(11), 1191-1201.

Tabela 1 Perfil de textura de salames tipo Italiano sonicados em banho US 25 kHz por 0 min (controle não sonificado), 3 min, 6 min ou 9 min após 90 dias de armazenamento

	0 min	3 min	6 min	9 min
Coesividade	0,44±0,01	0,43±0,01	0,42±0,01	0,44±0,01
Flexibilidade	6,23±0,12	6,30±0,12	6,10±0,12	6,05±0,12
Mastigabilidade	220,2±49,3	193,9±49,3	187,7±49,3	155,0±49,3
Dureza (N)	100,2±14,9	54,5±14,9	68,1±14,9	63,7±14,9

LS Means ± erro padrão da média (n=3).

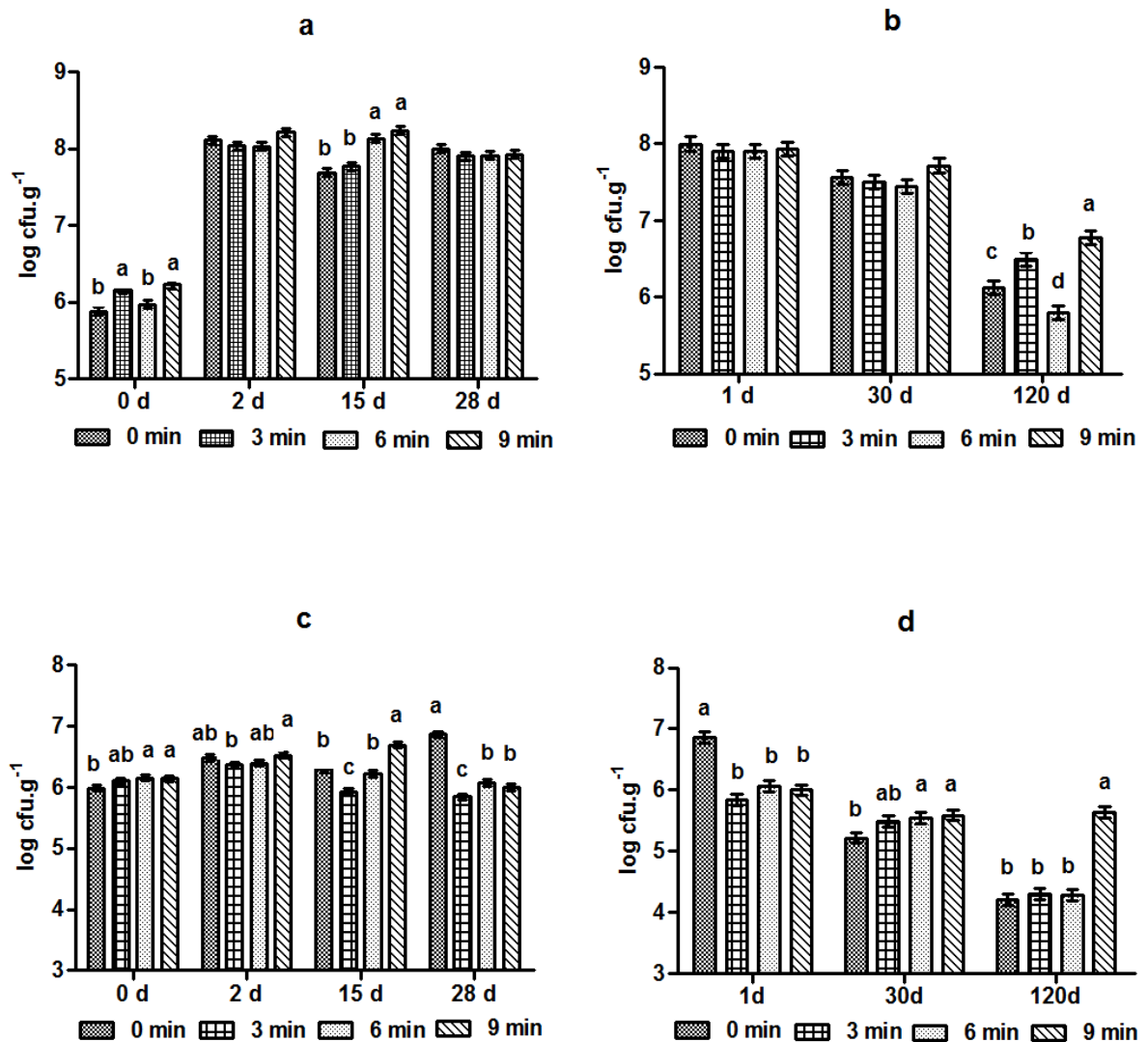


Fig.1 Viabilidade de micro-organismos em salame tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e armazenamento (1, 30 e 120 dias). (a) Bactérias lácticas / processamento, (b) Bactérias lácticas / armazenamento, (c) *Micrococcaeae* / processamento, (d) *Micrococcaeae* / armazenamento. Barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes em um mesmo dia denotam diferença estatística pelo teste de t ($p < 0,05$). Médias (LS Means) da triplicata de dois salames independentes.

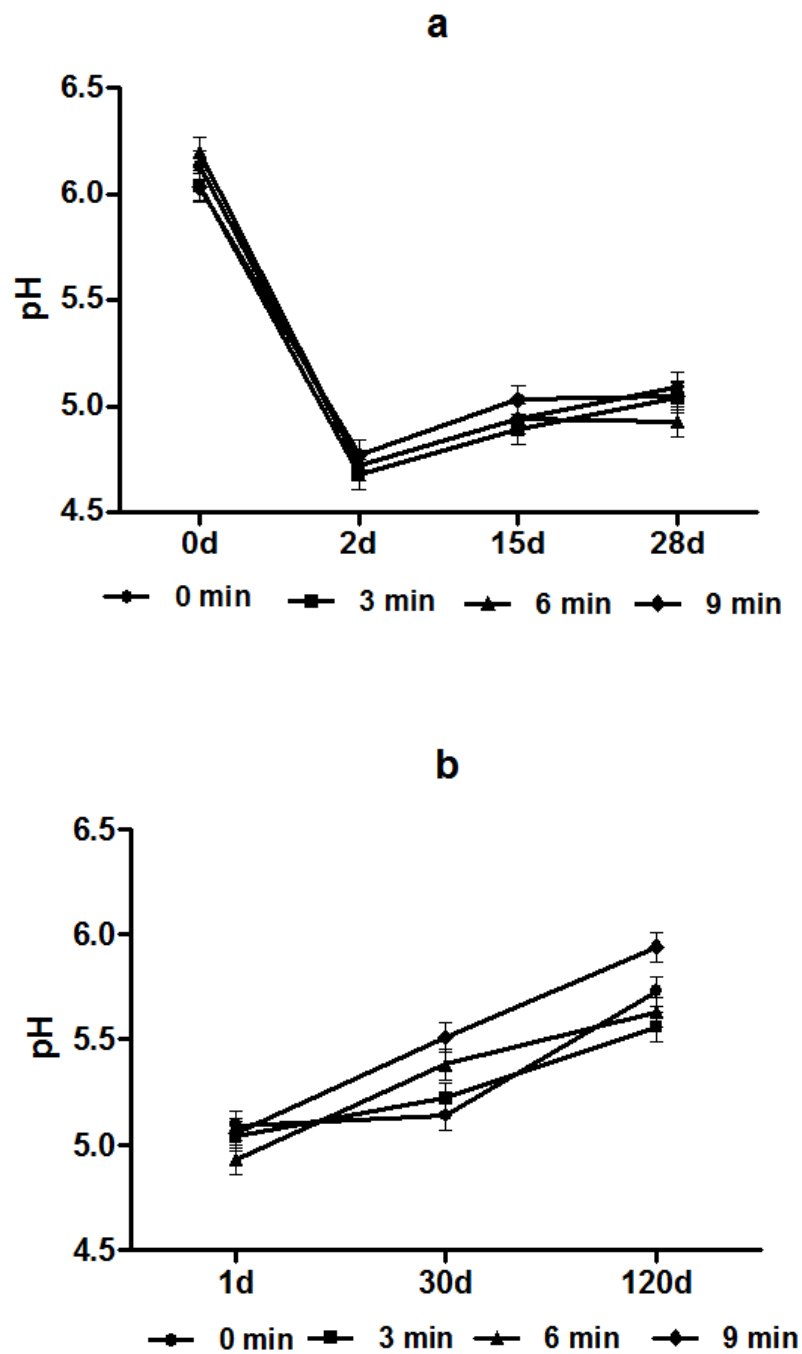


Fig. 2 Comportamento de pH de salames tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias). Barras de erros representam o erro padrão da média. Médias (LS Means) da triplicata de dois salames independentes.

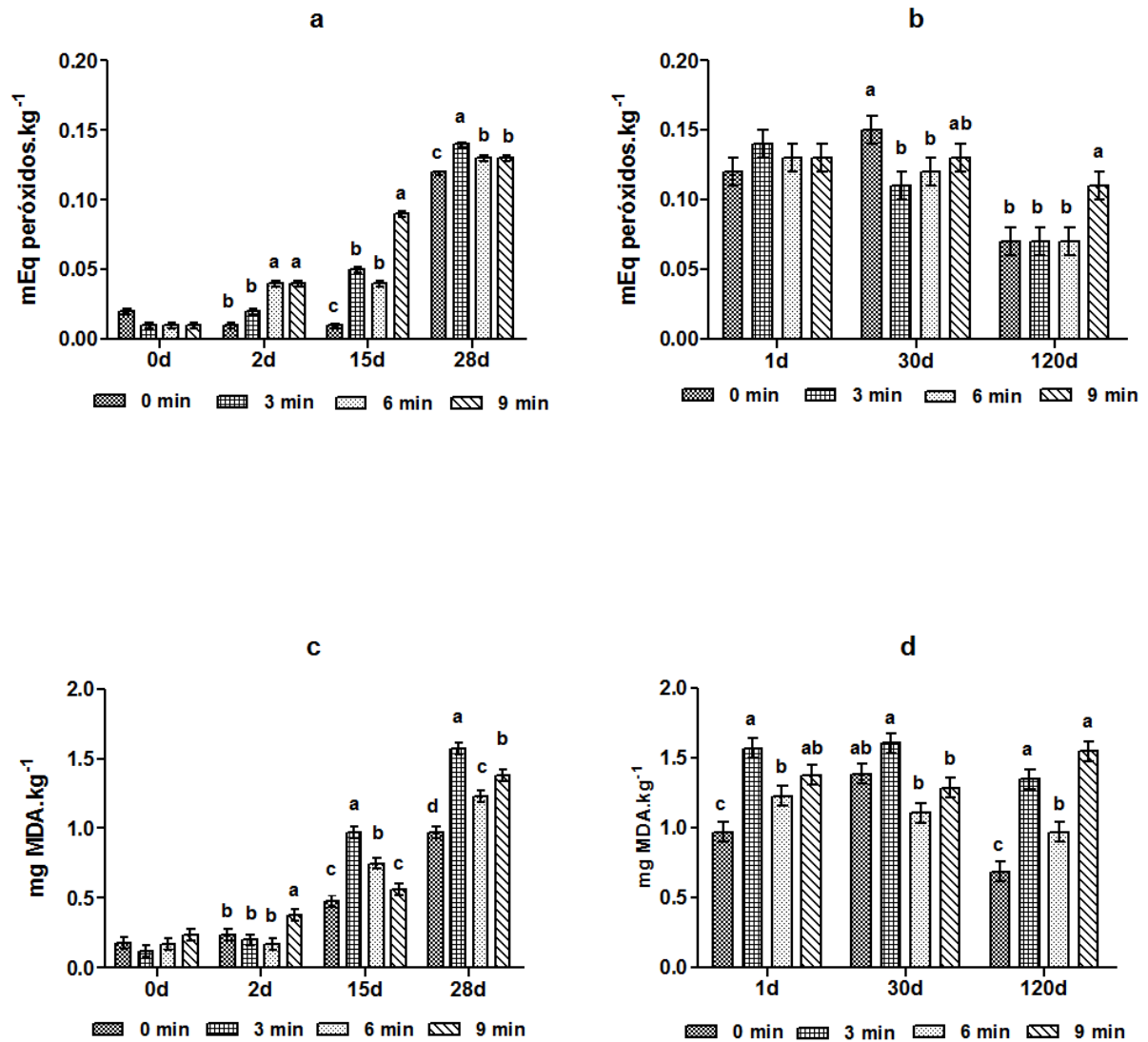


Fig. 3 Oxidação lipídica de salames tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e armazenamento (1, 30 e 120 dias). (a) Valor de peróxidos/processamento, (b) Valor de peróxidos/armazenamento, (c) TBARS/processamento, e (d) TBARS/armazenamento. Barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes em um mesmo dia indicam diferença estatística pelo teste de t ($p < 0,05$). Médias (LS Means) da análise em triplicata de dois salames independentes.

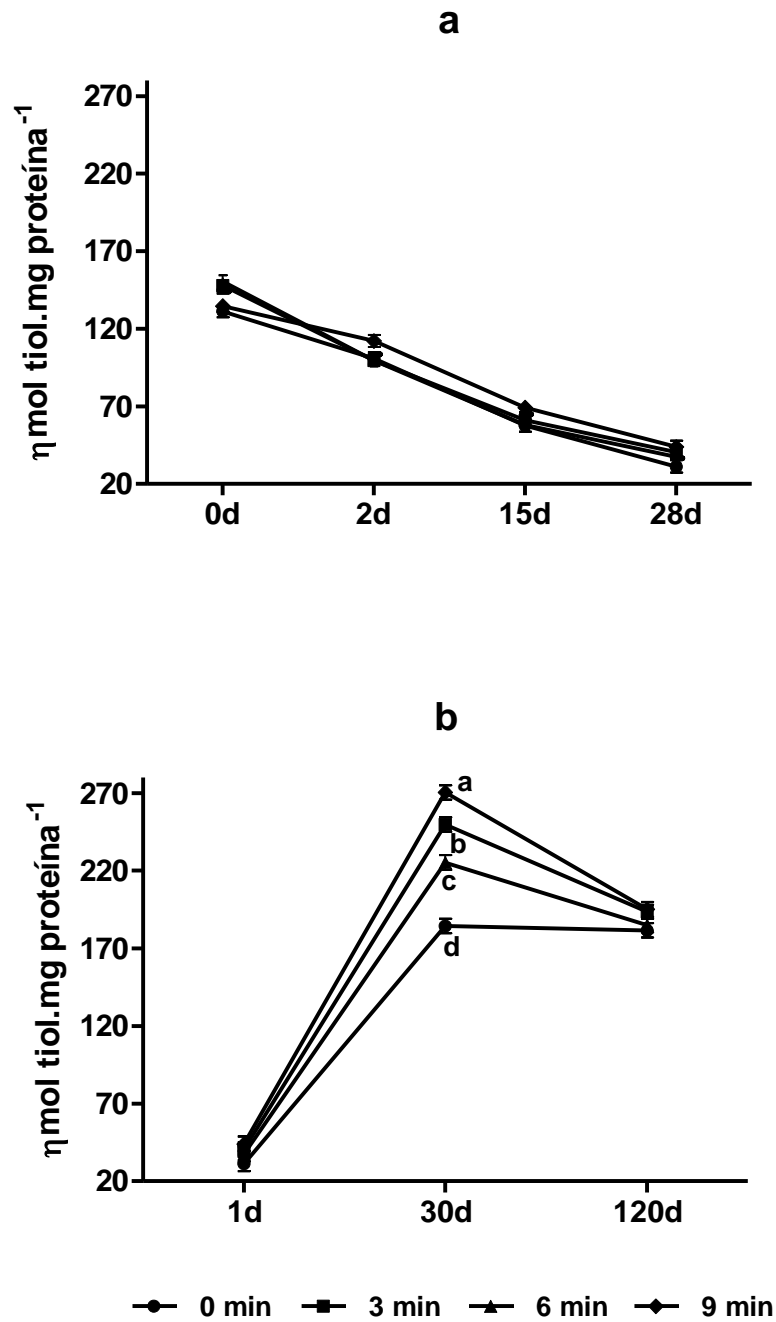


Fig. 4 Concentração de tiol (nanomol tiol.mg proteína⁻¹) de salames tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias). Barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes denotam diferença estatística pelo teste de t ($p < 0,05$). Médias (LS Means) da análise em triplicata de três salames independentes.

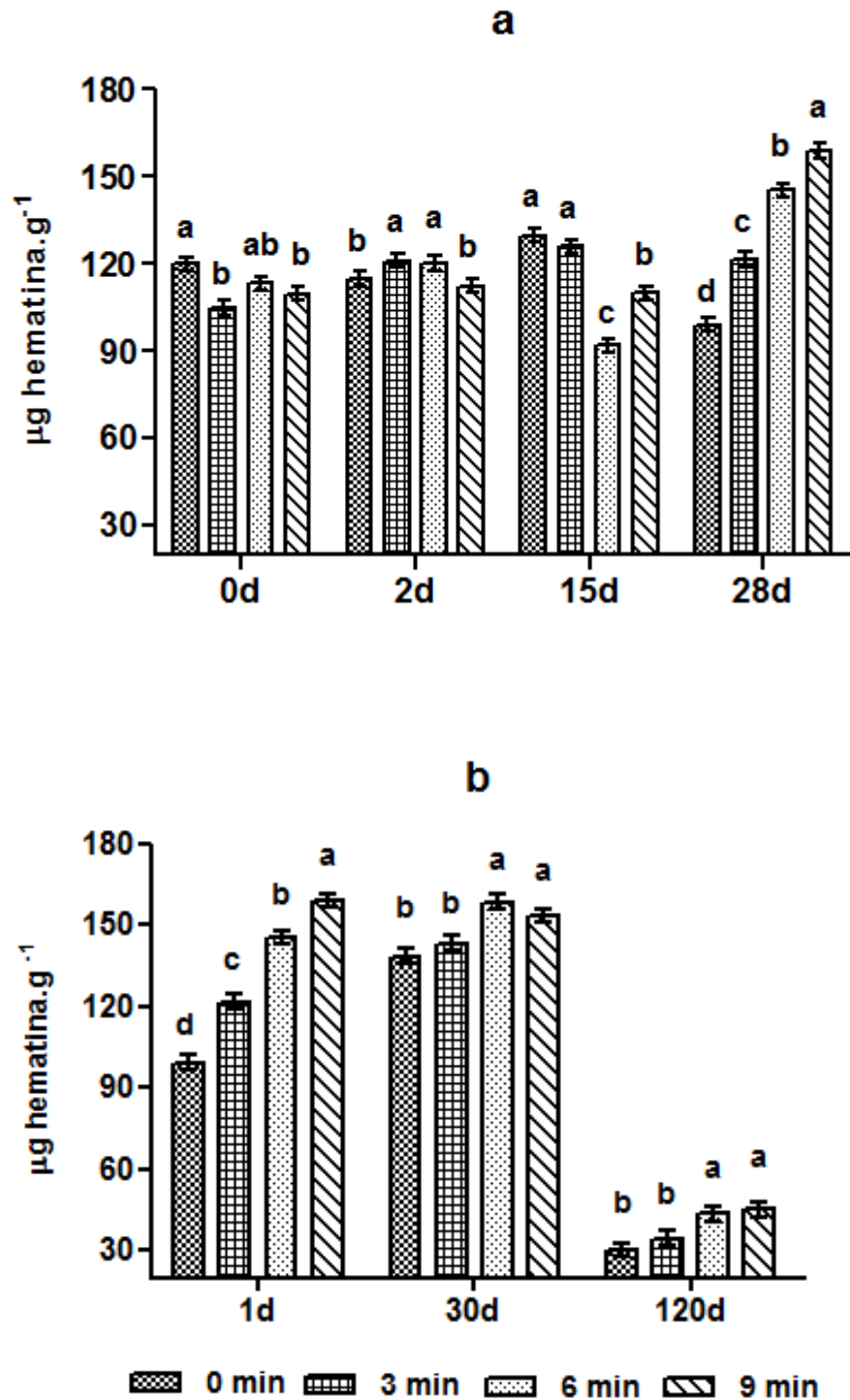


Fig. 5 Teor de pigmentos heme totais (PHT, $\mu\text{g hematina.g}^{-1}$) de salames expostos ao ultrassom por 0 min (controle não sonificado), 3 min, 6 min ou 9 min nas etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias). Barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes em um mesmo dia indicam diferença estatística pelo teste de t ($p < 0,05$). Médias (LS Means) da triplicata de dois salames independentes.

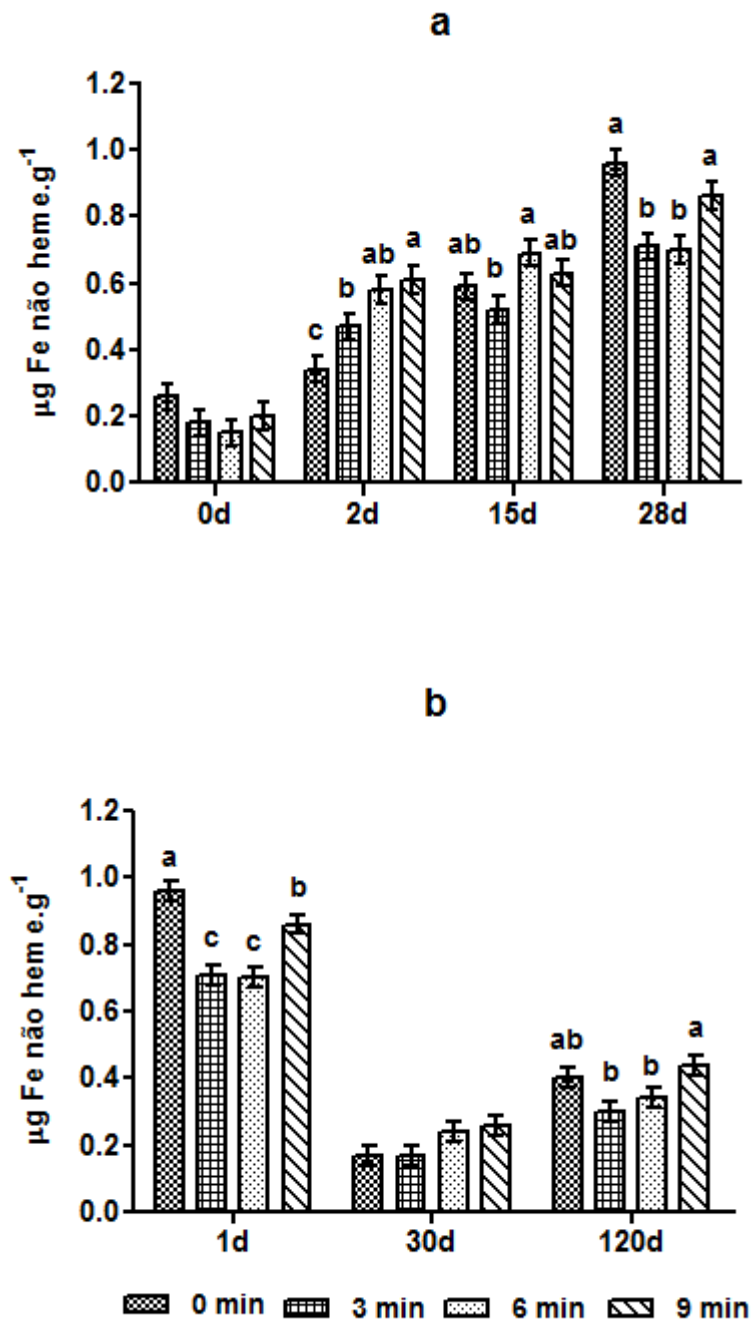


Fig. 6 Concentração de ferro não heme ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) em salames tipo Italiano sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias). Barras de erros representam o erro padrão da média. Letras diferentes em um mesmo dia denotam diferença estatística pelo teste de t ($p < 0,05$). Médias (LS Means) da triplicata de dois salames independentes.

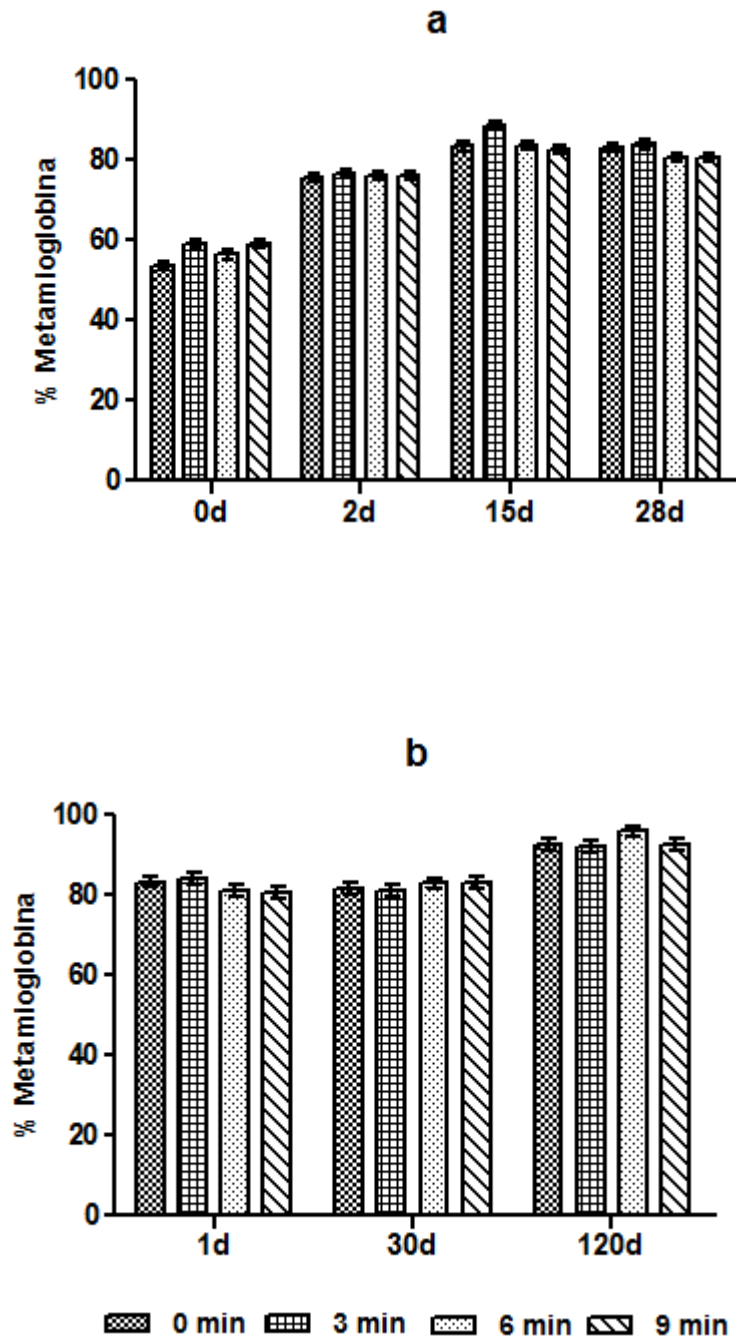


Fig. 7 Teor de metamioglobina (%) em salames tipo Italiano expostos ao ultrassom por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a) processamento (0, 2, 15 e 28 dias) e (b) armazenamento (1, 30 e 120 dias). Barras de erros representam o erro padrão da média. Médias (LS Means) da triplicata de dois salames independentes.

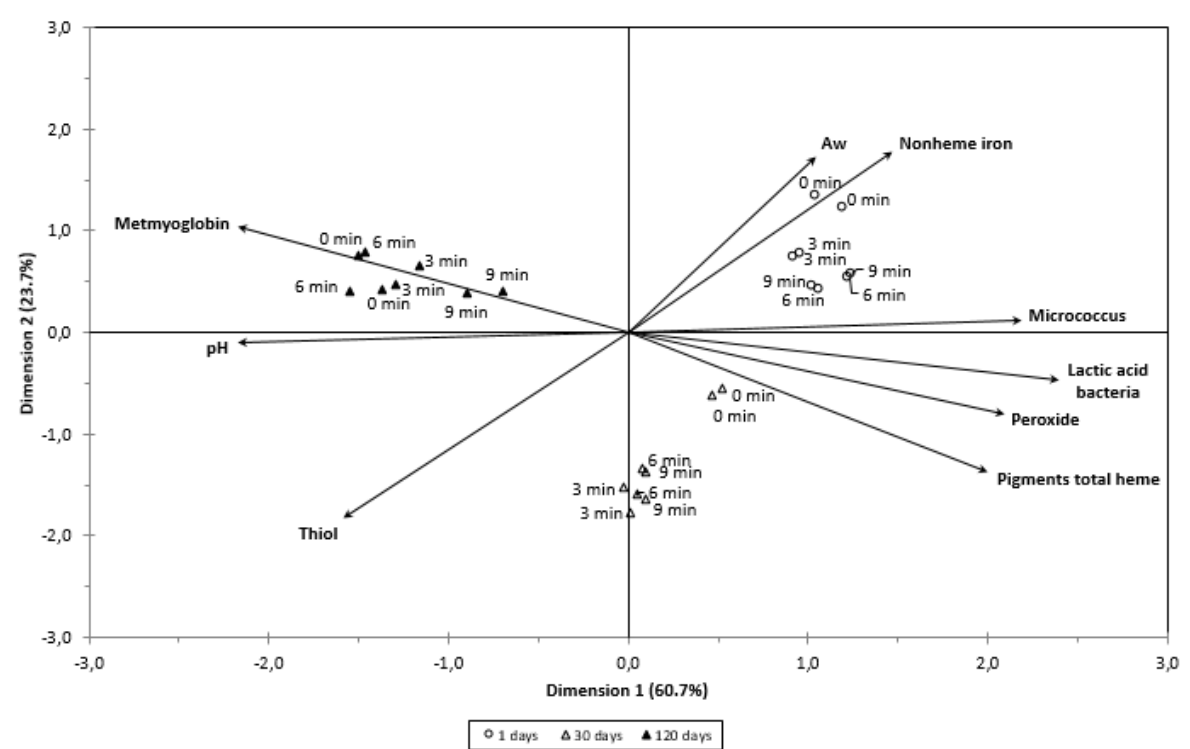
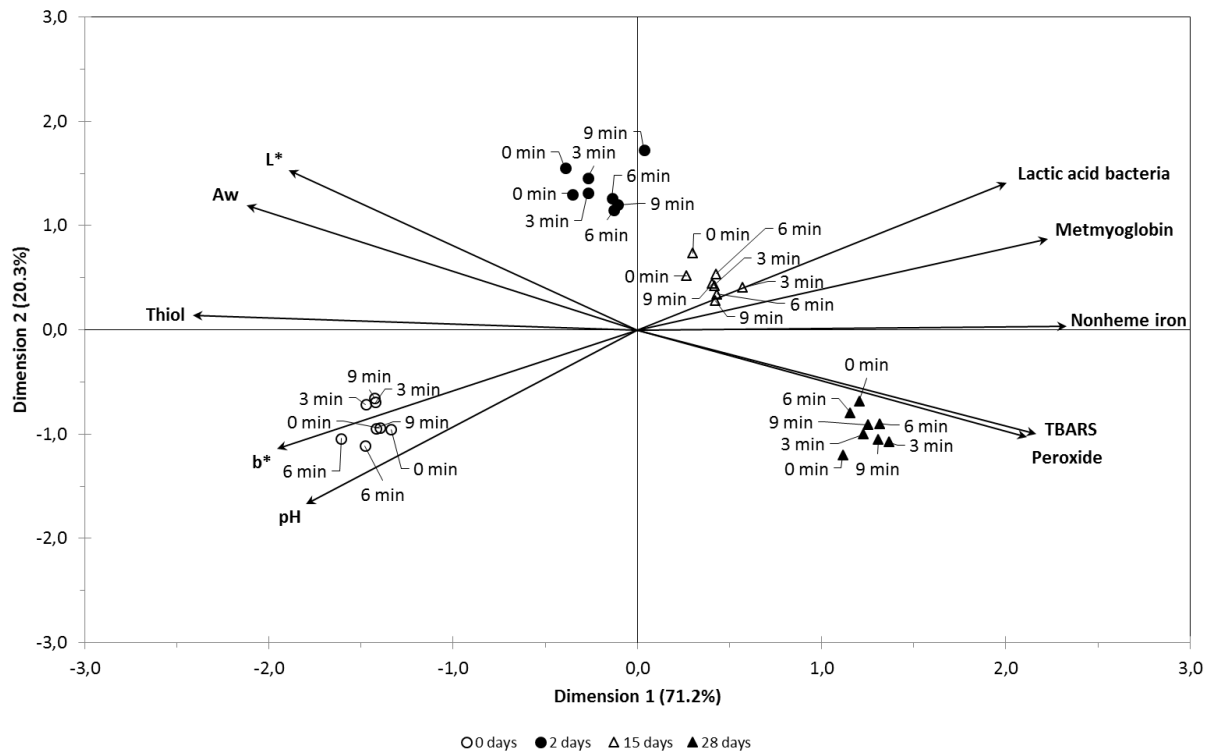
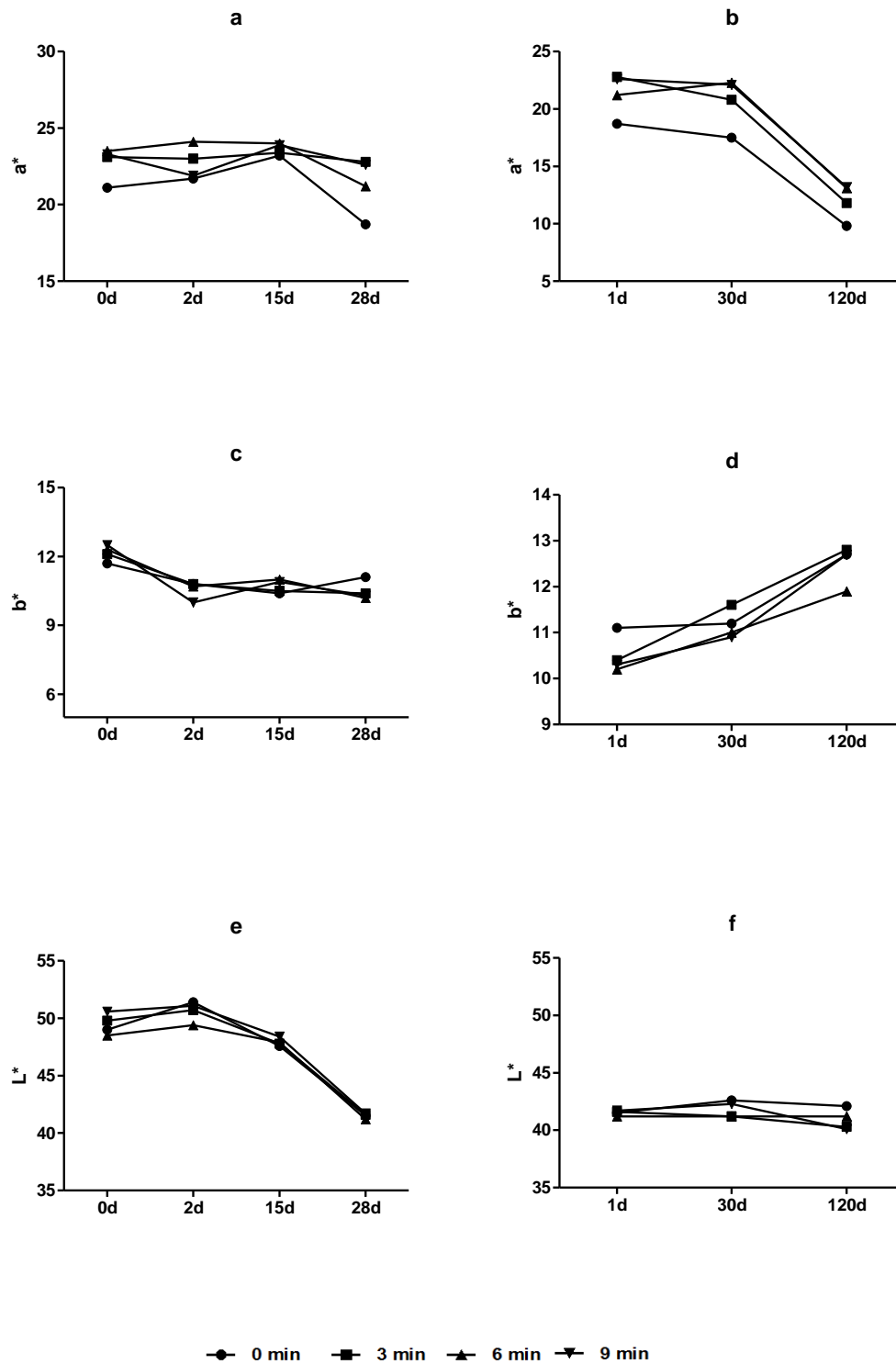


Fig. 8 Análise Discriminatória Canônica (a) Etapa de processamento (b) Etapa de armazenamento.

Material Suplementar



Parâmetros de cor CIE L^* (luminosidade), a^* (redness) e b^* (yellowness) de salames sonicados por 0 min (controle), 3 min, 6 min ou 9 min durante as etapas de (a), (c) e (e) processamento (0, 2, 15 e 28 dias), e (b), (d) e (f) armazenamento (1, 30 e 120 dias).

MANUSCRITO 2

**COMPOSTOS VOLÁTEIS DE SALAMES TIPO ITALIANO SUBMETIDOS
AO ULTRASSOM NO PROCESSAMENTO**

**Manuscrito em fase final de revisão pelos autores para ser submetido ao periódico Food
Research International
[versão em Português]**

(Configurado conforme as normas da revista – Anexo B)

ORIGINAL PAPER**Compostos voláteis de salames tipo Italiano submetidos ao ultrassom no
processamento**

**Larissa de Lima Alves ^a, Jossiê Zamperetti Donadel ^a, Dirceu Rodrigues Athayde ^a,
Marianna Stefanello da Silva ^a, Bruna Klein ^a, Mariane Bittencourt Fagundes ^a, Juliano
Smanioto Barin ^a, Cristiano Ragagnin de Menezes ^a, Paulo Cezar Bastianello
Campagnol ^a, Roger Wagner ^a, Alexandre José Cichoski ^{a*}**

*^a Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av. Roraima, 1000. Cidade Universitária.
Bairro Camobi. CEP 97105-900. Santa Maria, RS, Brasil.*

Fone +55-55-3220-8254; Fax: +55-55-3220-8254

*Autor para correspondência: Email: cijoale@gmail.com (Alexandre José Cichoski)

Resumo

O ultrassom (US) tem sido usado como tecnologia emergente no processamento de alimentos, mas pouco explorado em produtos cárneos fermentados como o salame. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do US na formação de compostos voláteis de salame tipo Italiano, quando submetidos ao banho de US (25 kHz, potência nominal 500W), usando diferentes tempos de exposição (0 min – controle não sonificado, 3 min, 6 min ou 9 min). Os compostos voláteis foram mensurados no início (1º dia) e no fim do armazenamento (após 120 dias). Não foram encontradas diferenças estatísticas nos compostos voláteis entre os diferentes tratamentos ($p>0,05$), com exceção de etanol e hexanol ($p<0,05$) no início do armazenamento. A falta de efeito pronunciado do US sobre os compostos voláteis foi atribuída a consistência do salame e ao baixo tempo de exposição ao tratamento com US.

Palavras-chave: tecnologia emergente, sonicação, oxidação lipídica, hexanal.

1 Introdução

O ultrassom (US) é um tipo de energia vibracional que abrange frequências superiores à 20 kHz, acima do limiar do ouvido humano (Mason, 1990). O US é capaz de provocar o fenômeno de cavitação, caracterizado por ciclos alternados de compressão e rarefação, formando bolhas em líquidos e promovendo microagitação (>100 kHz) ou, no caso da implosão das bolhas, a liberação de alto conteúdo de energia (<100 kHz) (Suslick, 1989). Pelos efeitos físicos, químicos e biológicos que a cavitação provoca, o US vem sendo explorado na ciência e tecnologia de alimentos com muitas finalidades (Cárcel et al., 2012; Awad et al., 2011; Chemat et al., 2011, Chandrapala et al., 2012). Bons resultados foram obtidos em alguns alimentos fermentados, como leite (Sakakibara et al. 1994; Wang e Sakakibara 1997; Wu et al. 2000; Nguyen et al. 2009, 2012), bebidas alcoólicas (Matsuura et al. 1994) e sucos de frutas (Costa et al., 2013) no sentido de aceleração do processo fermentativo e/ou melhora da qualidade do produto. Contudo, em produtos cárneos fermentados as pesquisas ainda são incipientes. Em outro trabalho, avaliamos o efeito da sonicação sobre fermentação, microbiologia, reações oxidativas e outros parâmetros de qualidade de salame tipo Italiano (Alves, 2016).

No Brasil, o salame tipo Italiano é produzido pela mistura de carnes bovina e suína moídas, acrescida de sal, agentes de cura, antioxidantes e temperos, embutida em tripas naturais ou artificiais, seguido de defumação opcional e secagem (Lucke 1994; Brasil, 2000). Durante a fermentação e sobretudo na maturação ocorrem uma série de mudanças físicas, microbiológicas e bioquímicas, as quais são responsáveis pela aparência, sabor e aroma característicos do produto, assim como por sua segurança e conservação (Terra, Fries & Terra, 2003).

O aroma do salame é típico e um dos mais importantes atributos de qualidade neste produto. As características de aroma do salame são provenientes da combinação de diferentes compostos voláteis e não voláteis a partir de temperos e como resultado da metabolização de carboidratos, lipídios e proteínas (Stahnke, 1994; Carballo, 2012). Neste processo, enzimas endógenas e bacterianas são essenciais, principalmente lipases e proteases (Molly et al., 1997). Estudos tem mostrado que o US é capaz de interferir positivamente na atividade de lipases (Delgado-Povedano e Castro, 2015) e proteases (Kadam et al., 2015; Ozuna et al., 2015). Alguns autores relataram que a sonicação favoreceu a formação de compostos voláteis indesejáveis em óleos vegetais (Chemat et al., 2004; Jahouach-Rabai et al., 2008) e em leite

(Reiner et al., 2009; Chouliara et al., 2010; Marchesini et al., 2015), enquanto outros trabalhos não encontraram efeito significativo do US sobre estes compostos em soro de queijo (Torkamani et al., 2014) e em azeite de oliva (Bejaoui et al., 2016).

Os alimentos analisados nestes estudos possuem características diferentes do salame, principalmente no que diz respeito à consistência e composição de lipídios, proteínas e carboidratos, o que pode interferir na formação dos compostos voláteis. Mudanças nas condições acústicas (aparato, frequência, intensidade, amplitude, tempo de exposição) também podem afetar a composição de voláteis (Juliano et al., 2014; Marchesini et al., 2015). Além disso, não se sabe como o US pode influenciar na formação de compostos voláteis após meses de armazenamento, pois os trabalhos realizados até então não avaliaram estes compostos após tanto tempo.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do US na formação de compostos voláteis em salames tipo Italiano durante etapa de armazenamento.

2 Materiais e Métodos

2.1 Produção dos salames e tratamento com US

Os salames tipo Italiano foram produzidos conforme descrito em Alves (2016), todos com a mesma formulação independente do tratamento. Após o embutimento, os salames foram sonicados em banho 25 kHz no modo normal (Elma[®] TI-H 5, Singen, Alemanha; potência nominal 500 W) com metade do volume máximo de água potável (cerca de 2,4 litros), sendo a água renovada após cada sonicação e ajustada para 20 °C. Cada lote foi submetido ao US por 0 min (controle, não sonicado), 3 min, 6 min ou 9 min, compondo os quatro tratamentos deste experimento. A potência fornecida foi determinada pelo método calorimétrico (Koda et al. 2003), considerando a variação de temperatura média observada nos diferentes tempos de exposição, obtendo-se os valores de 128 W, 96 W e 85 W para 3 min, 6 min e 9 min, respectivamente. Foram sonicados quatro salames por batelada, sendo que na metade do tempo de cada tratamento os salames foram invertidos para que a sonicação ocorresse de forma mais homogênea possível.

A etapa de produção durou 28 dias em câmara específica conforme descrito em Alves (2016). Os salames foram retirados da tripa e empacotados a vácuo em embalagem plástica de polietileno de baixa densidade e nylon de 30 μ com barreira ao oxigênio TPO₂ <30 (embaladora modelo 200B, Selovac, São Paulo, Brasil). Este foi considerado o dia 1 de armazenamento. Buscando simular condições comerciais, a estocagem foi em temperatura entre 15 e 25 °C sem abrigo da luz durante 120 dias. A composição centesimal foi determinada após 20 dias de armazenamento e estava de acordo com o preconizado pela legislação brasileira (umidade máx. 35%, gordura máx. 32%, proteína mín. 25% e carboidratos máx. 4%; Brasil 2000)

2.2 *Determinação de compostos voláteis*

2.2.1 *Preparo das amostras*

Nos períodos de análise previstos (dia 1 e 120 de armazenamento), foram coletadas amostras de três salames independentes de cada tratamento. Estas amostras foram empacotadas a vácuo (embaladora modelo 200B, Selovac, São Paulo, Brasil) e permaneceram congeladas em ultrafreezer (-80 °C) até análise. Em cada análise, a amostra congelada foi cortada em pequenos cubos e, em seguida, moída em processador de uso doméstico. Alíquota de 5 g de cada amostra homogeneizada foi colocada em um frasco de 20 mL, o qual foi imediatamente fechado com septo de face interna de PTFE/silicone, e desta forma submetido à extração.

2.2.2 *Extração e identificação dos compostos voláteis das amostras de salame*

O método de microextração em fase sólida foi utilizado para a extração dos compostos voláteis do *headspace* das amostras de salame. A fibra sorvente empregada foi a de revestimento misto Carboxen-PDMS (10 mm \times 75 μ m; Supelco, Bellefonte, PA, USA). A fibra foi previamente condicionada seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Os frascos contendo as amostras foram imersos em banho-maria na temperatura de 40 °C e o tempo de exposição da fibra no *headspace* da amostra foi de 45 min. Antes do período de extração o

frasco com a amostra permaneceu por um tempo de equilíbrio de 15 min na mesma temperatura de extração.

Os compostos voláteis foram dessorvidos termicamente pela inserção da fibra no injetor do cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS QP2010 Plus, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão) a temperatura de 260 °C, durante 10 min, no modo *split* de razão 1:5. Os compostos foram separados numa coluna capilar de sílica fundida de fase estacionária polar CP Wax 52CB (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Chrompack, Middelburg, The Netherlands). O hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura inicial da coluna foi 35 °C e mantida durante 5 min. Em seguida, um aumento de temperatura foi iniciado subindo a 2 °C min⁻¹ até 80 °C, seguido por um aumento a 4 °C min⁻¹ até 210 °C, onde foi mantida em condições isotérmicas durante 5 min. A interface do GC-MS foi mantida a 230 °C. O detector MS foi operado no modo de ionização por impacto de elétrons com uma energia de ionização de 70 eV e o analisador tipo quadropolos simples operando em modo de varredura em um intervalo de massas de 35-350 m/z. Uma série de n-alcenos homólogos (C6-C26) foi analisada sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (LRI). Os analitos foram tentativamente identificados com base na comparação com os espectros de massas disponíveis na biblioteca National Institute of Standards and Technology (NIST) e por comparação dos LRI calculados com aqueles disponíveis na literatura científica (Acree e Heinrich, 2016; El Sayed, 2016).

2.3 Análise estatística

O delineamento inteiramente casualizado foi adotado para o experimento. As médias de três repetições (n=3) de cada tratamento foram calculadas e expressadas como média ± desvio padrão. Os dados foram submetidos a análise de variância univariada (ANOVA) para testar a significância das variáveis e posteriormente as diferenças entre as médias calculadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica 7.1 for Windows (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA).

3 Resultados e Discussão

A análise dos compostos voláteis nos salames detectou no total mais de 200 compostos; no entanto, foram selecionados apenas aqueles que apareceram na maioria dos tratamentos. Não houve formação de compostos exclusivos para um ou outro tratamento. Dos 34 compostos selecionados, foram identificados álcoois (9), aldeídos (6), ácidos orgânicos (8), ésteres (4), terpenos (5) e cetonas (2) (Tabelas 1 e 2). Os hidrocarbonetos foram excluídos por não contribuírem de maneira significativa com o aroma do salame ou estarem presentes como contaminantes oriundos da embalagem plástica da carne ou do salame (Stahnke, 1994; 1995).

A maioria dos compostos identificados (Tabelas 1 e 2) também foram detectados em outros estudos com salame (Johansson et al., 1994; Stahnke 1994; 1995; Tabanelli et al., 2012; dos Santos et al., 2015; Montanari et al., 2016; Corral et al., 2015, 2016). Outras classes químicas frequentemente presentes em salame como nitrilas, fenóis, compostos sulfurosos, compostos aromáticos e lactonas (Stahnke, 1995; Spaziani et al., 2009) não foram encontrados em quantidade significativa (área <0,1%). Para alguns compostos foram encontrados elevados desvios-padrão, assim como nos trabalhos de Schimidt e Berger (1998), Moretti et al. (2004) e Montanari et al. (2016). Isto pode ser atribuído à alta complexidade da matriz do salame, por este possuir distribuição heterogênea de pedaços carne e gordura, dificultando a homogeneização da amostra (Ruiz et al., 1998).

No início do armazenamento (Tabela 1), a maior área considerada foi representada por aldeídos em todos os tratamentos. Os compostos hexanal, hexanol, acetona, pentanal, etanol e 2-butanona foram encontrados em ordem decrescente de maior representatividade, totalizando >45% da área considerada em ambos os períodos analisados. Hexanal, hexanol e pentanal estão ligados à oxidação lipídica (Corral et al., 2015, 2016) e estão associados a notas de grama, folhas verdes e odor de ranço (Stahnke, 1994), enquanto acetona, etanol e 2-butanona são derivados principalmente do catabolismo de carboidratos (Carballo, 2012). O composto terpeno β -pineno foi identificado no 1º e no 120º dia em elevada concentração. Terpenos também foram encontrados em grande quantidade em outros trabalhos com salame tipo Italiano (Meynier et al., 1999; Sunesen et al., 2001; Spaziani et al., 2009) e podem ser atribuídos aos temperos usados na mistura de condimentos, oriundo principalmente da pimenta (Spaziani et al., 2009).

A análise estatística apontou diferenças apenas entre os compostos etanol e hexanol ($p < 0,05$) no início do armazenamento (Tabela 1). O etanol é frequentemente encontrado em salame (Tabanelli et al., 2012) e deriva do metabolismo do piruvato por ação bacteriana (Stahnke, 1995). No dia 1, o tratamento com US por 9 min foi capaz de aumentar a produção do composto em relação a 3 min ($p < 0,05$), sem diferir do controle e 6 min US ($p > 0,05$). Acreditamos que estas diferenças tenham ocorrido em função de heterogeneidade da amostra.

Com relação ao hexanol, o uso de US aumentou significativamente a quantidade do composto no tratamento 3 min em comparação ao controle ($p < 0,05$) no 1º dia (Tabela 1). O hexanol é produto da auto-oxidação de lipídios (Corral et al., 2016) e neste período foi observado maior concentração de peróxidos ($p > 0,05$) e malonaldeído (TBARS, $p < 0,05$) no tratamento 3 min do que no controle ($p > 0,05$) (Alves, 2016).

O hexanal foi o composto encontrado majoritariamente no 1º dia de armazenamento em todos os tratamentos e no 120º dia para 9 min de US, enquanto o hexanol foi o principal composto no restante dos tratamentos após 120 dias ($p > 0,05$) (Tabela 2). Valores elevados de hexanal são esperados no salame por este ser um dos principais indicadores voláteis de oxidação do ácido linoleico (Shahidi e Pegg, 1994; Ordoñez et al., 1999) e sua produção ser favorecida pela presença de nitratos (Stahnke, 1995). No início do armazenamento foram encontrados maiores valores de área para hexanal do que no final do armazenamento, quando o aldeído pode ter sofrido reações de oxidação/redução (Ordóñez et al., 1999; Carballo, 2012) ou se ligado a peptídeos (Zhou e Decker, 1999). Apesar de não haver diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$), é visível que o uso de US por 3 e 6 min apresentou maior concentração de hexanal que o controle no início do armazenamento (Tabela 1). O tratamento por 9 min provavelmente apresentou concentrações menores de hexanal que os tratamentos 3 min e 6 min por se encontrar em um estágio mais avançado de oxidação, quando o hexanal já sofreu outras reações (Ordóñez et al., 1999; Zhou e Decker, 1999; Carballo, 2012).

A formação de compostos de flavour em salames é resultado de complexas reações, inclusive oxidativas (Ordoñez et al., 1999). O US é considerado capaz de acelerar reações oxidativas pela formação de radicais livres e outras espécies reativas durante a sonicação, as quais podem facilmente reagir com compostos oxidáveis (Soria e Villamiel, 2010; Kentish e Ashokkumar, 2011). Em outra parte de nosso estudo com os mesmos tratamentos (Alves, 2016), o US acelerou a velocidade de formação de peróxidos e TBARS, mas manteve os valores dentro de níveis aceitáveis do ponto de vista de formação de odor desagradável.

Jahouach-Rabai et al. (2008) relataram a presença de compostos voláteis causadores de *off-flavours* de odor metálico e de ranço (hexanal, hept-2-enal e 2(E),4(E)-decadienal) em azeites de oliva tratados com US (sonda 20 kHz) após 30 min. Do mesmo modo, Chemat et al. (2004) também observaram a formação de voláteis indesejáveis (hexanal, (Z)-hept-2-enal e limoneno) em óleo de girassol sonicado por 0,5 – 30 min com sonda de 20 kHz. Por outro lado, Bejaoui et al. (2016) reportam que o uso de transdutores de US com frequência de 40 kHz acoplados a um sistema de extração de azeite de oliva (fluxo 20-25 kg.h⁻¹) não afetou a concentração de compostos importantes de oxidação (hexanal, pentanal, (E)-2-hexenal). O tempo de sonicação e os parâmetros acústicos (frequência, intensidade, potência, amplitude) são apontados como fatores preponderantes do efeito do US sobre os compostos voláteis (Juliano et al., 2014; Marchesini et al., 2015).

Em nosso estudo, não observamos diferença significativa na formação de *off-flavours* com o uso de US ($p > 0,05$) provavelmente pelo uso de menores tempos de sonicação e de banho ultrassônico (menor transmissão de energia que a sonda) em comparação aos estudos citados. Os extremos de temperatura provocados pela cavitação duram apenas nanossegundos, o que pode desfavorecer reações multi-etapas (Ong et al., 2015) como as de formação de compostos voláteis. Juliano et al. (2014) afirmam que, além do tempo de sonicação, o teor de gordura do leite interferiu na formação de compostos voláteis. A gordura usada na produção do salame é mais saturada que a dos óleos vegetais já estudados e, portanto, pode necessitar de mais tempo de sonicação para liberar compostos relacionados à oxidação. A consistência mais sólida do salame e o fato de a gordura estar envolvida pela carne dificultam a penetração da onda ultrassônica, o que pode ter minimizado o efeito do US sobre reações químicas ligadas à formação de compostos voláteis.

4. Conclusão

Nas condições usadas neste trabalho, o US não afetou de maneira expressiva a formação de compostos voláteis em salames tipo Italiano. Alguns compostos mudaram a concentração do início para o fim do armazenamento, sem, contudo, influenciar a formação de *off-flavours*. Consideramos que o aparato de US usado no experimento (banho US), os tempos curtos de exposição e a composição da gordura podem ter contribuído para falta de efeito expressivo do US.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da Universidade Federal de Santa Maria, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Referências

- Acree, T.E., & Heinrich, A. (April 2016). Tastenet and human odor space, gas chromatography–olfactometry (GC–O) of natural products. (<http://tastenet.org/tastenet.html>).
- Alves, L.L. (2016) Uso de ultrassom no processamento de salame. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.
- Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D. & Youssef, M.M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48, 410-427.
- Bejaoui, M.A., Beltran, G., Aguilera, M.P. & Jimenez, A. (2016). Continuous conditioning of olive paste by high power ultrasounds: Response surface methodology to predict temperature and its effect on oil yield and virgin olive characteristics. *LWT – Food Science and Technology*, 69, 175-184.
- Brasil (2000). Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salame tipo Alemão, de Salame tipo Calabres, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburgues, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Linguiça Colonial e Pepperoni. In: Ministério da Agricultura PeA (ed), Instrução Normativa nº 22. , 03/08/2000, 15-28. *Diário Oficial da União*, Brasília [in portuguese].
- Carballo, J. (2012). The role of fermentation reactions in the generation of flavor and aroma of foods. In: Metha, B.M.; Kamal-Eldin, A. & Iwanski, R.Z. (Eds.) *Fermentation: effects on food properties* (pp.51-88). New York: CRC Press.
- Cárcel, J.A., García-Pérez, J.V., Benedito, J. & Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*. 110, 200-207.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S. & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19, 975-983.

- Chemat, F., Grondin, I., Costes, P., Moutoussamy, L., Sing, A.S.C. & Smadja, J. (2004). High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, *11*, 281-285.
- Chemat, F., Zill-e-Huma & Khan, M.K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*, 813-835.
- Corral, S., Leitner, E., Siegmund, B. & Flores, M. Determination of sulfur and nitrogen compounds during the processing of dry fermented sausages and their relation to amino acid generation. *Food Chemistry*, *190*, 657-664.
- Costa, M.G.M., Fonteles, T.V., de Jesus, A.L.T. & Rodrigues, S. (2013). Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. *Food Chemistry*, *139*, 261-266.
- Chouliara, E., Georgogianni, K.G, Kanellopoulou, N. & Kontominas, M.G. (2010). Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of araw, thermized and pasteurized milk. *International Dairy Journal*, *20*, 307-313.
- Delgado-Povedano, M.M. & Castro, M.D.Q. (2015). A review on enzyme and ultrasound: a controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*, *889*, 1-21.
- Dos Santos, B.A., Campagnol, P.C.B., Fagundes, M.B., Wagner, R. & Pollonio, M.A.R. (2015). Generation of volatile compounds in Brazilian low-sodium dry fermented sausages containing blends of NaCl, KCl and CaCl₂ during processing and storage. *Food Research International*, *74*, 306-314.
- El-Sayed, A.M. (April 2016). The Pherobase. (URL <http://www.pherobase.com>).
- Jahouach-Rabai, W., Trabelsi, M., Van Hoed, V., Adams, A., Verhé, R., De Kimpe, N. & Frikha, M.H. (2008). Influence of bleaching by ultrasound on fatty acids and minor compounds of olive oil. Qualitative and quantitative analysis of volatile compounds (by SPME coupled to GC/MS). *Ultrasonics Sonochemistry*, *15*, 590-597.
- Juliano, P., Torkamani, A.E., Leong, T., Kolb, V., Watkins, P., Ajlouni, S. & Singh, T.K. (2014). Lipid oxidation volatiles absent in milk after selected ultrasound processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, *21*(6), 2165-2175.
- Johansson, G., Berdagué, J-L., Larsson, M., Tran, N. & Borch, E. (1994). Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science*, *38*, 203-218.
- Kadam, S.U., Tiwari, B.K., Álvarez, C. & O'Donnell, C.P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, *46*, 60-67.

- Kentish, S. & Ashokkumar, M. (2011). The physical and chemical effects of ultrasound. In: Feng H, Barbosa-cánovas G.V. & Weiss J (Eds) *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*. 1 edn. (pp 1-13). CRC Press: New York.
- Koda, S., Kimura, T., Kondo, T. & Mitome, H. (2003). A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system. *Ultrasonics Sonochemistry*, *10*, 149-156.
- Marchesini, G., Balzan, S., Montemurro, F., Fasolato, L., Andrighetto, I., Segato, S. & Novelli, E. (2012). Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *16*, 391-397.
- Marchesini, G., Fasolato, L., Novelli, E., Balzan, S., Contiero, B., Montemurro, F., Andrighetto, I. & Segato, S. (2015). Ultrasonic inactivation of microorganisms: A compromise between lethality capacity and sensory quality of milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *29*, 215-221.
- Matsuura, K., Hirotsune, M., Nunowawa, Y., Satoh, M. & Honda, K. (1994). Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *77*, 36-40.
- Meynier, A., Novelli, E., Chizzolini, R., Zanardi, E., & Gandemer, G. (1999). Volatile compounds of commercial Milano salami. *Meat Science*, *51*, 175–183.
- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. & Greenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. *Food Chemistry*, *59*, 539-545.
- Montanari, C., Bargossi, E., Gardini, A., Lanciotti, R., Magnani, R., Gardini, F. & Tabanelli, G. (2016). Correlation between volatile profiles of Italian fermented sausages and their size and starter culture. *Food Chemistry*, *192*, 736-744.
- Moretti, V.M., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M.A., Panseri, S., Pirone, G. & Gandini, G. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science*, *66*, 845-854.
- Nguyen, T.M.P., Lee, Y.K. & Zhou, W. (2009). Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by highintensity ultrasound. *International Dairy Journal*, *19*, 410-416.
- Nguyen, T.M.P., Lee, Y.K. & Zhou, W. (2012). Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. *Food Chemistry*, *130*, 866-874.
- Ong, O.X.H., Seow, Y., Ong, P.K.C. & Zhou, W. (2015) High-intensity ultrasound production of Maillard reaction flavor compounds in a cysteine-xylose model system. *Ultrasonics Sonochemistry*, *26*, 399-407.

- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *34*, 329–367.
- Ozuna, C., Puig, A., García-Pérez, J.V., Mulet, A. & Cárcel, J.A. (2013). Influence of high intensity ultrasound application on mass transport, microstructure and textural properties of pork meat (*Longissimus dorsi*) brined at different NaCl concentrations. *Journal of Food Engineering*, *119*, 84-93.
- Reiner, R., Noci, F., Denis, A., Morgan, D. & Lyng, J. (2009). Characterization of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal*, *19*, 269-272.
- Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Andrés, A., & García, C. (1999). Volatile compounds of drycured Iberian ham as affected by the length of the curing process. *Meat Science*, *52*, 19–27.
- Sakakibara, M., Wang, D., Ikeda, K. & Suzuki, K. (1994). Effect of ultrasonic irradiation on production of fermented milk with *Lactobacillus delbrueckii*. *Ultrasonics Sonochemistry*, *1*, S107-S110.
- Schmidt, S. & Berger, R.G. (1998). Aroma compounds in fermented sausages of different origins. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, *31*, 559-567.
- Shahidi, F. & Pegg, R.B. (1994). Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, *1*, 177-186.
- Soria, A.C. & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*, 323-331.
- Spaziani, M., Torre, M.D. & Stecchini, M.L. (2009). Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Science*, *81*, 77-85.
- Stahnke, L.H. (1994). Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Science*, *38*, 39-53.
- Stahnke, L.H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels — Part II. Volatile components. *Meat Science*, *41*, 193–209.
- Sunesen, L.O., Dorigoni, V., Zanardi, E. & Stahnke, L.H. (2001). Volatile compounds released during in Italian dried sausage, *Meat Science*, *58*, 93-97.
- Suslick, K.S. (1989). The Chemical Effects of Ultrasound. *Scientific American*, 80-86.
- Tabanelli, G., Coloretti, F., Chiavari, C., Grazia, L., Lanciotti, R. & Gardini, F. (2012). Effects of starter cultures and fermentation climate on the properties of two types of typical Italian dry fermented sausages produced under industrial conditions. *Food Control*, *26*, 416-426.

- Terra, A., Fries, L.L. & Terra, N.N. (2004). *Particularidades na fabricação do salame*. Editora Varela: São Paulo.
- Torkamani, A.E., Juliano, P., Ajlouni, S. & Singh, T.K. (2014). Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 951-957.
- Wang, D. & Sakakibara, M. (1997). Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4, 255-261.
- Wu, H., Hulbert, G.J. & Mount, J.R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 211-218.
- Zhou, S. & Decker, E.A. (1999). Ability of amino acids, dipeptides, polyamines and sulfhydryls to quench hexanal, a saturated aldehydic lipid oxidation product. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 47, 1932-1936.

Tabela 1 Área ($\times 10^6$) dos compostos voláteis de salames tipo Italiano submetidos ao banho de US 25 kHz no processamento – 1º dia de armazenamento

Composto	LRI ¹	Tempo de sonicação			
		0 min	3 min	6 min	9 min
2-Metilpropanal	818	3,15±0,90	3,37±0,09	3,37±0,83	3,24±0,34
Butanal	886	1,17±0,02	1,51±0,67	1,23±0,43	1,16±0,32
3-Metilbutanal	922	10,32±0,97	8,47±0,96	10,25±1,06	9,66±1,70
Pentanal	988	19,49±5,31	30,56±18,62	33,57±18,78	30,94±19,19
Hexanal	1089	87,09±0,86	281,60±63,60	304,06±66,46	117,25±10,04
(E)2-Heptenal	1343	9,01±2,65	9,91±7,13	6,67±4,75	5,86±3,67
Total Aldeídos		130,23	335,43	286,56	113,97
Acetato de etila	898	21,03±1,87	14,63±0,67	16,12±2,03	21,53±4,59
Propanoato de etila	962	0,62±0,40	0,66±0,48	0,57±0,27	0,96±0,04
Acetato de propila	982	0,63±0,13	0,52±0,13	0,75±0,15	0,65±0,14
Acetato de 1-metilpropila	994	16,13±5,78	8,90±0,00	8,05±0,00	7,17±0,00
2-Metil butanoato de etila	1052	0,78±0,87	0,27±0,07	0,25±0,06	0,38±0,08
3-Metil butanoato de etila	1070	0,30±0,06	0,31±0,12	0,38±0,05	0,52±0,22
Acetato de hexila	1278	0,50±0,05	2,24±0,22	0,97±0,83	1,53±0,73
Total Ésteres		39,99	27,54	27,09	32,74
2-Propanona	828	32,70±3,32	32,14±5,60	35,01±27,06	42,20±4,66
2-Butanona	912	23,55±3,78	33,22±1,13	33,84±7,76	14,93±8,80
Total Cetonas		56,25	65,37	68,86	57,14
2-Propanol	936	5,61±1,66	2,98±0,00	3,47±1,64	3,76±0,00
Etanol	943	27,50±5,62 ^{ab}	19,45±0,49 ^b	22,90±5,74 ^{ab}	37,76±0,93 ^a
2-Butanol	1032	33,42±30,47	10,11±0,93	12,10±9,99	7,41±2,90
3-Metilbutanol	1216	2,20±0,79	1,55±1,07	2,55±1,87	4,04±1,89
1-Pentanol	1259	12,08±3,99	12,66±8,63	12,21±6,84	12,41±8,35
2-Heptanol	1332	0,13±0,04	0,31±0,13	0,33±0,16	0,16±0,03
Hexanol	1366	22,17±10,63 ^b	54,62±6,24 ^a	50,61±4,27 ^{ab}	37,26±9,32 ^{ab}
1-octen-3-ol	1463	3,52±0,87	10,71±2,21	9,58±0,43	4,86±4,02
2-Fenil-etanol	1941	2,41±1,00	1,37±0,86	1,23±0,75	1,64±0,79
Total Álcoois		109,03	113,76	114,99	109,30
Ácido acético	1469	5,87±3,43	19,05±9,76	7,49±4,30	48,61±58,53
Ácido butanoico	1624	0,84±0,37	0,82±0,56	0,87±0,41	1,91±2,39
Ácido 3-metilbutanoico	1663	5,06±4,50	2,03±0,91	1,16±0,92	3,00±1,58
Ácido pentanoico	1741	1,25±0,61	2,10±1,43	3,43±2,97	3,67±2,49
Ácido hexanoico	1849	7,62±3,54	12,87±8,23	6,23±4,97	19,27±9,82
Total ácidos		20,64	36,88	19,18	76,47
α -pineno	1014	2,92±0,41	3,50±0,67	4,68±1,45	3,68±0,10
β -pineno	1095	68,83±14,78	49,85±0,00	69,73±64,63	54,14±10,64
3-careno	1134	2,29±0,05	0,69±0,00	2,91±1,37	0,94±0,20
p-cimeno	1269	1,45±0,25	1,97±1,75	1,76±0,48	1,38±0,00
Linalool	1554	9,47±0,71	9,36±2,55	9,67±2,86	8,57±1,54
Total Terpenos		84,96	65,37	88,75	68,70

Resultados expressos como média±desvio padrão (n=3).¹Linear Retention Index. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo Teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 2 Área ($\times 10^6$) dos compostos voláteis de salames tipo Italiano submetidos ao banho de US 25 kHz no processamento – 120º dia de armazenamento

Composto	LRI ¹	Tempo de sonicação			
		0 min	3 min	6 min	9 min
2-Metilpropanal	818	6,58±1,74	3,46±4,49	10,25±2,75	4,77±2,90
Butanal	886	3,58±1,15	4,19±1,39	4,10±1,83	0,84±0,55
3-Metilbutanal	922	15,46±1,52	10,83±2,31	13,40±1,51	12,61±2,36
Pentanal	988	Nd	13,54±1,83	9,48±0,00	nd
Hexanal	1089	47,71±10,06	37,49±14,72	23,22±9,61	58,96±2,98
(E)2-Heptenal	1343	0,96±0,69	4,98±2,13	1,68±0,06	3,09±1,13
Total Aldeídos		74,29	74,49	62,14	80,27
Acetato de etila	898	18,13±0,29	20,63±2,33	19,80±4,92	14,33±1,07
Propanoato de etila	962	0,85±0,53	0,92±0,08	1,10±0,14	1,03±0,60
Acetato de propila	982	0,61±0,06	0,75±0,29	0,98±0,21	0,77±0,09
Acetato de 1-metilpropila	994	7,74±0,53	6,55±2,32	6,02±0,89	8,59±0,00
2-Metil butanoato de etila	1052	0,18±0,03	0,17±0,09	0,25±0,05	0,37±0,03
3-Metil butanoato de etila	1070	0,30±0,10	0,26±0,09	0,37±0,03	0,45±0,07
Acetato de hexila	1278	3,47±0,22	3,55±2,20	6,87±7,64	2,37±0,16
Total Ésteres		31,29	32,84	35,39	27,90
2-Propanona	828	24,51±6,04	22,83±0,98	25,67±3,85	25,24±7,23
2-Butanona	912	23,06±7,55	33,04±6,04	36,37±7,94	45,29±27,13
Total Cetonas		47,57	55,87	62,04	70,53
2-Propanol	936	7,15±1,47	4,49±1,20	7,58±0,52	5,64±1,31
Etanol	943	23,39±0,38	24,22±5,39	35,94±0,71	21,38±9,26
2-Butanol	1032	31,66±4,48	27,29±10,39	27,05±6,05	35,81±15,79
3-Metilbutanol	1216	4,00±1,24	3,94±0,62	4,10±1,27	3,00±1,45
1-Pentanol	1259	8,40±3,50	7,02±2,55	6,82±4,35	7,21±1,34
2-Heptanol	1332	0,26±0,07	0,72±0,84	0,89±0,37	1,31±0,43
Hexanol	1366	53,55±17,08	54,42±16,80	70,19±12,19	35,82±8,92
1-octen-3-ol	1463	3,46±1,15	6,13±1,59	3,53±0,57	3,68±0,35
2-Fenil-etanol	1941	1,07±0,58	0,90±0,19	1,02±0,19	1,52±0,11
Total Álcoois		132,94	129,14	157,14	115,38
Ácido acético	1469	19,43±20,40	16,74±0,00	7,17±1,34	18,67±18,84
Ácido butanoico	1624	0,46±0,19	0,69±0,35	0,60±0,13	0,46±0,21
Ácido 3-metilbutanoico	1663	2,19±0,71	1,72±0,59	2,22±0,65	3,42±0,84
Ácido pentanoico	1741	1,15±0,65	1,42±0,81	1,59±1,39	1,47±0,30
Ácido hexanoico	1849	7,10±5,98	11,37±7,71	11,09±10,13	10,15±2,31
Total ácidos		30,33	31,95	22,68	34,17
α -pineno	1014	3,57±0,39	4,25±1,23	3,84±1,74	4,00±0,40
β -pineno	1095	36,67±2,60	48,10±14,43	23,22±9,61	44,26±3,28
3-careno	1134	1,00±0,66	1,56±0,81	1,67±0,42	1,55±0,77
p-cimeno	1269	0,87±0,21	1,17±0,57	1,57±0,42	1,21±0,31
Linalool	1554	4,52±0,96	5,64±1,97	6,08±1,02	6,92±0,24
Total Terpenos		46,63	60,73	36,37	57,95

Resultados expressos como média±desvio padrão (n=3).¹Linear Retention Index. nd = não detectado.

4 DISCUSSÃO GERAL

O US vem sendo considerado como meio de modificar as características de um processo ou produto por interferir nas propriedades físicas, químicas, bioquímicas e microbiológicas de diferentes alimentos (PUHL; MASON, 2001). As modificações são atribuídas principalmente ao fenômeno de cavitação instável, que pode liberar alto conteúdo de energia, capaz de acelerar reações químicas, danificar células e afetar macromoléculas e enzimas (SUSLICK, 1989; CHEMAT; ZILLI-E-HUMA; KHAN, 2011; CHANDRAPALA et al., 2012; ALARCON-ROJO et al., 2015; ASHOKKUMAR, 2015). Buscando aprofundar conhecimentos sobre os efeitos do uso desta tecnologia na área de carnes, inicialmente foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o tema, gerando o Artigo 1 (Apêndice B).

A aplicação do US em bioprocessos como meio de promover o desenvolvimento de micro-organismos e seu metabolismo ainda é pouco explorada (CHISTI, 2003; KWIATKOWSKA et al., 2011). O efeito em processos biológicos depende das condições acústicas, do micro-organismo e do alimento em questão (PUHL; MASON, 2001; PIYASENA; MOHAREB; McKELLAR, 2003). O US também pode interferir em características importantes do alimento, como oxidação, cor, textura e compostos voláteis (POHLMANN; DIKEMAN; ZAYAS, 1997a,b; CHEMAT et al., 2004; JAYASOORIYA et al., 2007; BERMÚDEZ-AGUIRRE; MOBBS; BARBOSA-CÁNOVAS, 2011). Neste contexto alguns alimentos já foram avaliados, mas os estudos disponíveis na literatura se concentraram principalmente em alimentos líquidos e com vida de prateleira curta. Especificamente sobre o salame, ainda existe uma lacuna sobre as implicações do uso do US de um modo geral.

Sendo assim, o primeiro objetivo do trabalho foi investigar como aparatos de US (banho e sonda) e alguns parâmetros acústicos (frequência, potência e intensidade) influenciavam na viabilidade de micro-organismos da carne (*Semitendinosus* bovino), bem como sobre textura, oxidação e cor. Os resultados foram incluídos no Artigo 2 (Apêndice C). Neste trabalho inicial comparamos banho (45 kHz) e sonda de US (20 kHz) por tempos de 0, 60, 120 e 240 segundos, verificando que estes não afetaram expressivamente o crescimento de micro-organismos psicrófilos, mesófilos e de bactérias lácticas, tampouco a oxidação e cor, independentemente do aparato usado. Foi observada influência do US sobre a textura da carne, com redução da *WBS force* logo após sonicação (dia zero), mas o efeito não perdurou ao longo do armazenamento por 16 dias.

Aliado a constante revisão bibliográfica, este trabalho serviu de base para realização de outros, que em conjunto guiaram a escolha dos parâmetros acústicos adotados no experimento final. Deste modo, deu-se sequência aos Manuscritos 1 e 2.

No Manuscrito 1 objetivamos avaliar como o uso do banho US (25 kHz, 500 W) influenciou na viabilidade de bactérias lácticas (*Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici*) e *Micrococcaceae* (*Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus*) e sobre o processo fermentativo de salame tipo Italiano (acompanhado pela medida de atividade de água e queda de pH), quando usado por diferentes tempos de exposição (0, 3, 6 e 9 min). Além disso, características importantes que interferem na qualidade do salame foram avaliadas, como cor, oxidação lipídica e proteica e textura. Algumas variáveis que influenciam nestas características e que poderiam ser suscetíveis à ação do US também foram quantificadas (pigmentos heme totais, ferro não heme e formação de metamioglobina). Como o salame muda suas características físicas, bioquímicas e microbiológicas ao longo do tempo, avaliamos a interferência do US desde o processamento até o fim da vida de prateleira do produto. Para isso, as análises foram feitas nas duas etapas, sendo no processamento avaliados no dia da fabricação/sonicação (dia zero) e depois de 2, 15 e 28 dias, e no armazenamento com 1, 30 e 120 dias.

Neste trabalho verificamos que o US modificou a curva de crescimento das bactérias estudadas, estimulando o crescimento em alguns pontos e inibindo em outros. Contudo, estas alterações não afetaram o processo fermentativo, uma vez que as amostras sonicadas apresentaram comportamento de pH e de atividade de água similar ao controle. O tratamento por 9 min mostrou ser o mais efetivo para estimular o crescimento, possivelmente por ser o de menor potência fornecida (85 W) em comparação aos demais (3 min – 128 W; 6 min – 96 W) (ERRIU et al. 2014; TURANTAŞ; KILIÇ; KILIÇ, 2015). Diversos mecanismos são discutidos na literatura científica para justificar o aumento na viabilidade de micro-organismos pelo US (LIN; WU, 2002; JOYCE et al., 2003; CHISTI, 2003; PITT; ROSS, 2003; FENG; YANG; HIELSCHER, 2008; NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009; BERMÚDEZ-AGUIRRE; MOBBS; BARBOSA-CÁNOVAS, 2011; GAO et al., 2014a,b; BARUKČIĆ et al., 2015; ALARCON-ROJO et al., 2015). Este aumento foi observado logo após a sonicação (dia zero), principalmente pelo US exercer efeito imediato sobre os micro-organismos (NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009; YEO; LIONG, 2011, 2013). Apesar de alguns trabalhos descreverem efeito temporário do US (CHISTI, 2003; NGUYEN; LEE; ZHOU, 2009; YEO;

LIONG, 2011, 2013), após 120 dias de armazenamento o tratamento por 9 min ainda demonstrava estímulo à manutenção da viabilidade de bactérias lácticas e *Micrococcaceae*. Acreditamos que isto tenha ocorrido pelo US aumentar a disponibilidade de nutrientes (FENG; YANG; HIELSCHER, 2008) ou por ter inativado micro-organismos competitivos (BILEK; TURANTAŞ, 2013; MARCHESINI et al., 2015).

As reações oxidativas lipídicas (medidas pelo valor de peróxidos, TBARS e compostos voláteis) foram aceleradas com a sonicação. O US é considerado capaz de afetar a oxidação pela formação de radicais livres e outras espécies reativas, as quais podem facilmente reagir com compostos oxidáveis (SORIA; VILLAMIEL, 2010; KENTISH; ASHOKKUMAR 2011). Em função disso, no final do armazenamento (120 dias), os tratamentos sonicados ainda se apresentavam com reações de oxidação ocorrendo em alta velocidade, em comparação ao controle. A oxidação proteica, avaliada pela quantificação do grupo tiol, só teve influência significativa do US nos salames com 30 dias de armazenamento. O aumento na concentração de tiol foi proporcional ao tempo de exposição, possivelmente pela maior desnaturação (POHLMANN; DIKEMAN; ZAYAS, 1997) ter exposto grupos SH livres do interior da proteína (GROSSI et al., 2014).

Verificamos que fatores pró-oxidantes como ferro não heme e metamioglobina afetaram as reações oxidativas e vice-versa. O ferro não heme sofreu influência do US em alguns pontos de análise, com aumento na concentração proporcionalmente ao tempo de exposição. O uso de US também aumentou a formação de metamioglobina no processamento, quando a média dos valores obtidos para as amostras sonicadas foi superior ($p < 0,05$) à média do controle para o mesmo período. No entanto, durante a etapa de armazenamento, quando geralmente ocorre maior formação do pigmento oxidado, houve apenas efeito isolado do tempo ($p < 0,05$), sem interferência do tratamento ($p > 0,05$).

Os pigmentos heme totais foram afetados pelo uso de US, com aumento da concentração na maioria dos pontos avaliados, tanto no processamento quanto no armazenamento. Isto fez com que a instrumental da coloração vermelha dos salames (parâmetro a^* do sistema CIELAB, *redness*) tendesse a aumentar, embora sem efeito estatisticamente significativo ($p > 0,05$). A cor, especialmente a tonalidade avermelhada, é um dos parâmetros de qualidade mais importantes para o salame (MARCHESI et al., 2006) e seria interessante avaliar o efeito de outras combinações de parâmetros acústicos sobre este atributo. Tanto nos testes preliminares quanto no experimento final os parâmetros de cor

demonstraram ser passíveis da influência do US, ainda que de modo não significativo estatisticamente ($p>0,05$).

Além da cor, a textura também é fator de qualidade importante para este produto. Em nosso estudo visualizamos possibilidade do US influenciar positivamente a textura do salame ($p>0,05$), mas são necessárias avaliações do perfil de textura em mais pontos do armazenamento. Em cortes de carnes o efeito do US sobre a textura é amplamente abordado na literatura científica, mas em produtos derivados da carne os resultados ainda são incipientes, com espaço para novas pesquisas.

Por fim, avaliamos o efeito do US sobre compostos voláteis do salame (Manuscrito 2), pela importância que este atributo possui perante o consumidor. O US mostrou ser capaz de influenciar na formação de *off-flavours* em alguns alimentos (CHEMAT et al., 2004; JAHOUACH-RABAI et al., 2008; REINER et al., 2009; CHOULIARA et al., 2010; MARCHESINI et al., 2015), enquanto outros trabalhos não encontraram efeito significativo do US sobre estes compostos (TORKAMANI et al., 2014; BEJAOUI et al., 2016). Em nosso trabalho não verificamos influência significativa ($p>0,05$) do uso de US na formação de compostos voláteis na etapa de armazenamento do salame, com exceção de etanol e hexanol ($p<0,05$) no primeiro dia de estocagem. A formação de *off-flavours* ligados à oxidação também não foi influenciada significativamente ($p>0,05$) pelo US. A falta de efeito pronunciado do US sobre os compostos voláteis foi atribuída ao baixo tempo de exposição, consistência do salame, composição da gordura e uso de antioxidante na formulação do produto.

De acordo com nosso conhecimento, este é um dos primeiros trabalhos que avalia o efeito do US como tecnologia emergente na produção de derivado cárneo fermentado, especialmente salame. De um modo geral, obtivemos alguns efeitos positivos do uso do US (crescimento de micro-organismos) e algumas tendências que podem ser melhor exploradas, como cor e textura. Do mesmo modo, a falta de efeito também foi observada sobre algumas características importantes, como desidratação e formação de compostos voláteis, ressaltando que o uso de US não prejudicou estes parâmetros. As condições acústicas (frequência, potência, intensidade, amplitude) podem ser combinadas de maneiras diferentes, além de tempos maiores de exposição, em novos estudos. O uso de US na indústria de alimentos ainda é principiante e, embora pesquisas neste contexto venham sendo progressivamente realizadas, ainda existem lacunas que podem ser estudadas.

5 CONCLUSÕES

Após a finalização deste trabalho concluímos que:

- O uso de US no processamento de salame tipo Italiano influenciou no crescimento das bactérias lácticas (*Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici*) e *Micrococcaceae* (*Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus carnosus*) nas etapas de processamento e armazenamento. No entanto, isto não refletiu na aceleração do processo fermentativo;

- O US não influenciou de maneira significativa na atividade de água e na cor do salame, mas a tonalidade vermelha mostrou tendência a aumentar com o US com o aumento do tempo de sonicação. Embora o US tenha afetado o comportamento de pH na etapa de armazenamento, manteve valores na faixa de pH descrita na literatura para o produto;

- O uso de US acelerou a oxidação lipídica dos salames, mas os valores obtidos foram considerados aceitáveis. A oxidação proteica não foi afetada de maneira expressiva pelo tratamento com US;

- A sonicação aumentou a concentração de pró-oxidantes ferro não heme e metamioglobina, os quais influenciaram nas reações oxidativas e vice-versa;

- O uso de US influenciou na formação de pigmentos heme totais, o que pode interferir na tonalidade vermelha do salame;

- Parâmetros de textura (dureza e mastigabilidade) mostraram tendência a reduzir com a sonicação, mas não de maneira significativa;

- O uso de US não afetou a formação de compostos voláteis considerados importantes para o *flavour* do salame tipo Italiano;

- Nas condições trabalhadas e com base em nossos resultados, o uso de US não mostrou ser promissor no processamento de salame tipo Italiano. No entanto, novas combinações de parâmetros acústicos (frequência, intensidade, potência, amplitude) e tempos de exposição podem ser testados, com a finalidade de obter resultados diferentes.

REFERÊNCIAS

- AHNSTRÖM, M.L. et al. Effects of pelvic suspension of beef carcasses on quality and physical traits of five muscles from four gender-age groups. **Meat Science**, v. 90, n. 3, p. 528-535, 2012.
- ALARCON-ROJO, A.D. et al. Power ultrasound in meat processing. **Meat Science**, v. 107, p. 86-93, 2015.
- ALVES, L.L. et al. O ultrassom no amaciamento de carnes. **Ciência Rural**, v. 43, n. 8, p. 1522 – 1528, 2013.
- AQUILANTI, L. et al. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 136 – 145, 2007.
- ASHOKKUMAR, M. et al. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 155 – 160, 2008.
- BARUKČIĆ, I. et al. Influence of high intensity ultrasound on microbial reduction, physico-chemical characteristics and fermentation of sweet whey. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 94-101, 2015.
- BEJAOUI, M.A. et al. Continuous conditioning of olive paste by high power ultrasounds: Response surface methodology to predict temperature and its effect on oil yield and virgin olive characteristics. **LWT – Food Science and Technology**, v. 69, p. 175-184, 2016.
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; MOBBS, T.M.; BARBOSA-CÁNOVAS, V. Ultrasound applications in food processing. In: FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WEISS, J. (Eds). **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Nova York: CRC Press, 2011. p. 65 – 106.
- BILEK, S.E.; TURANTAŞ, F. Decontamination efficiency of high power ultrasound in the fruit and vegetable industry, a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 155-162, 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Cárneos. Instruções Normativas nº 20, 21 e 22, de 31 de Julho de 2000. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 de Agosto de 2000.
- CARBALLO, J. The role of fermentation reactions in the generation of flavor and aroma of foods. In: METHA, B.M.; KAMAL-ELDIN, A.; IWANSKI, R.Z. (Ed.) **Fermentation: effects on food properties**. Nova York: CRC Press, 2012. p.51 - 88.
- CÁRCEL, J.A. et al. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 200-207, 2012.

CHANDRAPALA, J. et al. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 975-983, 2012.

CHEMAT, F. et al. High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.11, n.5, p. 281-285, 2004.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p. 813-835, 2011.

CHISTI, Y. Sonobioreactors: using ultrasound for enhanced microbial productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 89-93, 2003.

CHOULIARA, E. et al. Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of araw, thermized and pasteurized milk. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 307-313, 2010.

COSTA, M.G.M. et al. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, 139, n. 1-4, p.261-266, 2013.

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

DICKENS, J.A. et al. Effect of ultrasonic irradiation on some physical characteristics of broiler breast muscle and cooked meat. **Poultry Science**, v. 70, n. 1, p. 389-396, 1991.

DOLATOWSKI, Z.J.; STADNIK, J.; STASIAK, D. Applications of ultrasound in food technology. **Technologia Alimentaria**, v. 6, p. 89-99, 2007.

ERRIU, M. et al. Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 15-22, 2014.

EWE, J. et al. Effects of ultrasound on growth, bioconversion of isoflavones and probiotics properties of parent and subsequent passages of *Lactobacillus fermentum* BT 8633 in biotin-supplemented soymilk. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 890-900, 2012.

FENG, H.; YANG, W.; HIELSCHER, T. Power ultrasound. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 5, p. 433-436, 2008.

GAO, S. et al. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound:1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 1, p. 446 – 453, 2014.

GIMENO, O.; ASTIASARAN, I.; BELLO, J. Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl₂ on texture and colour of dry fermented sausages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 873-877, 1999.

GONZALEZ-FERNANDEZ, C. et al. The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. **Meat Science**, v. 74, p. 467–475, 2006.

GOT, F. et al. Effects of high-intensity high frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physic-chemical properties of beef. **Meat Science**, v. 51, n. 1, p. 35-42, 1999.

GROSSI, A. et al. High pressure treatment of brine enhanced pork semitendinosus: Effect on microbial stability, drip loss, lipid and protein oxidation, and sensory properties. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 22, p. 11-21, 2014.

HACIAS, K.J. Guide to acid, alkaline, emulsion and ultrasonic cleaning. **ASM International**, Ohio, EUA, 1997.

HU, Y. et al. Analysis of the tenderization of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) meat by ultrasonic treatment using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 160, n. 1, p. 219 – 225, 2014.

HUGAS, M.; MONFORT, J.M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 547 – 554, 1997.

JAYASOORIYA, S.D. et al. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *Semitendinosus* and *Longissimus* muscles. **Meat Science**, v. 75, p. 628-639, 2007.

JAHOUACH-RABAI. W. et al. Influence of bleaching by ultrasound on fatty acids and minor compounds of olive oil. Qualitative and quantitative analysis of volatile compounds (by SPME coupled to GC/MS). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 15, n. 4, p. 590-597, 2008.

JOYCE, E. et al. Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 4, p. 862 – 870, 2011.

KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. The physical and chemical effects of ultrasound. In: FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.; WEISS, J. (Eds). **Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Nova York: CRC Press, 2011. p. 1 -13.

KODA, S. et al. A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, n. 3, p. 149-156, 2003.

KWIATKOWSKA, B. et al. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 768-780, 2003.

LEADLEY, E.; WILLIAMS, A. Procesado com pulsos electricos, ultrasonidos de potencia y otras tecnologias emergentes. In: BRENNAM, J. G. **Manual del procesado de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2008. Cap. 7, p. 203-237.

LIN, L.; WU, J. Enhancement of shikonin production in single- and two-phase suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells using low-energy ultrasound. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 1, p. 81-88, 2001.

LÜCKE, F. Fermented meat products. **Food Research International**, v. 27, n. 3, p. 299 – 307, 1994.

MARCHESI, C.M. et al. Influência das condições de armazenamento sobre pigmentos cárneos e a cor do salame Italiano fatiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 697 – 704, 2006.

MARCHESINI, G. et al. Ultrasonic inactivation of microorganisms: A compromise between lethal capacity and sensory quality of milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 215-221, 2015.

MASON, T.J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.P. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 3, n. 3, p. S253 – S260, 1996.

MASON, T.J.; PETERS, D. **Practical sonochemistry: power ultrasound uses and applications**. 2ª ed. New York: Woodhead Publishing, 2002. 166p.

MATSUURA, K. et al. Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n.1, 36-40, 1994.

MELENDO, J. A. et al. Limited proteolysis of myofibrillar proteins by bromelain decreases toughness of coarse dry sausage. **Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 429–433, 1996.

MENEGAS, L.Z. et al. Dry-fermented chicken sausage produced with inulin and corn oil: physicochemical, microbiological and textural characteristics and acceptability during storage. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p. 501 – 506, 2013.

NGUYEN, T.M.P.; LEE, Y.K.; ZHOU, W. Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 410-416, 2009.

NGUYEN, T.M.P.; LEE, Y.K.; ZHOU, W. Effect of high intensity ultrasound on carbohydrate metabolism of bifidobacteria in milk fermentation. **Food Chemistry**, v. 130, p. 866-874, 2012.

NIKOLIC, S. et al. Ultrasound assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. **Food Chemistry**, v. 122, p. 216-222, 2010.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280p.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R.C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 207-216, 2003.

POHLMAN, F.W. et al. The effect of low-intensity ultrasound treatment on shear properties, color stability and shelf-life of vacuum-packaged beef *semitendinosus* and *biceps femoris* muscles. **Meat Science**, v. 45, n. 3, p. 329-337, 1997.

PUHL, S.S.; MASON, T.J. The uses of ultrasound for biological decontamination. In: Mason T.J., Andreas (Ed) **Advances in Sonochemistry**, vol 6. 1 ed. Elsevier Sciences B.V.:Amsterdam. 2001. p. 1-24.

PITT, W.G.; ROSS, S.A. Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 1038 – 1044, 2003.

PRÄNDL, O. et al. **Tecnología e higiene de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 853p.

POVEY, M.; MASON, T. **Ultrasound on food processing**. London: Blackie Academic and Professional, 1998.

QIAN, Z.; STOODLEY, P.; PITT, W.G. Effect of low intensity ultrasound upon biofilm structure from confocal scanning laser microscopy observation. **Biomaterials**, v. 17, n. 20, p. 1975-1980, 1996.

REINER, R. et al. Characterization of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 269-272, 2009.

SCETAR, M. et al. Shelf life of packaged sliced dry fermented sausage under different temperature. **Meat Science**, v. 93, n. 13, p. 802 – 809, 2013.

SORIA, A.C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 7, p. 323-331, 2011.

SPAZIANI, M.; DEL TORRE, M.; STECCHINI, M.L. Changes of physicochemical, microbiological and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. **Meat Science**, v. 81, n. 1, p. 77 – 85, 2009.

SIKES, A. et al. Quality properties of pre- and post-rigor beef muscle after interventions with high frequency ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 6, p. 2138 – 2143, 2014.

SIRÓ, I. et al. Application of an ultrasonic assisted curing technique for improving the diffusion of sodium chloride in porcine meat. **Journal of Food Engineering**, v. 91, n. 2, p. 353 – 362, 2009.

SMITH, N.B. et al. Tenderization of Semitendinosus muscle using high intensity ultrasound. In: **Ultrasonics Symposium**, Florida, p. 1371 – 1373, 1991.

STADNIK, J.; DOLATOWSKI, Z.J. Influence of sonication on Warner-Bratzler shear force, colour and myoglobin of beef (*M.semimembranosus*). **European Food Research Technology**, v.233, p.553-559, 2011.

STAHNKE, L.H. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels - Part I. Chemical and bacteriological data. **Meat Science**, v. 41, p.179-191, 1995.

SULAIMAN, A.Z. et al. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 141-150, 2011.

SUSLICK, K.N. The chemical effects of ultrasound. **Scientific American**, p. 80 – 86, 1989.

TABANELLI, G. et al. Effects of aw at packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 94, n. 2, p. 177 – 186, 2013.

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

TERRA, N.N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Unisinos, 2001. 216p.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados: técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 1988. 119 p.

TORKAMANI, A.E. et al.. Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, n. 3, p. 951-957, 2014.

TURANTAŞ, F.; KILIÇ, G.B.; KILIÇ, B. Ultrasound in the meat industry: General applications and decontamination efficiency. **International Journal of Food Microbiology**, v. 198, p. 59-69, 2015.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J, P. **Carne y productos cárnicos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1998. 423 p.

WANG, D.; SAKAKIBARA, M. Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 4, n. 3, p. 255 – 261, 1997.

WU, H.; HULBERT, G.J.; MOUNT, J.R. Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 1, p. 211-218, 2001.

YEO, S.; LIONG, M. Effect of ultrasound on the growth of probiotics and bioconversion of isoflavones in prebiotic – supplemented soymilk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 885 – 897, 2011.

YEO, S.; LIONG, M. Effect of ultrasound on bioconversion of isoflavones and probiotics properties of parent organisms and subsequent passages of *Lactobacillus*. **LWT**, v. 51, v. 51, n. 1, p. 289 – 295, 2013.

APÊNDICE A

EXPERIMENTOS PRELIMINARES

- Experimento para definir aparato de US

Para determinar o tipo de sistema de aplicação que seria utilizado, foram contrastados os aparatos banho (Elma® TI-H 5, Singen, Alemanha; 45 kHz, 500 W) e sonda (VC 750, Sonics & Materials, Newtown, EUA; 20 kHz, 750 W) pelos tempos de exposição de 0, 60, 120 e 240 segundos em *Semitendinosus* bovino (corte lagarto ou tatu, 40 x 60 x 20 mm), a fim de verificar como os dois sistemas de aplicação afetariam principalmente a microbiota da carne (micro-organismos mesófilos, psicotróficos e bactérias lácticas), a cor e a oxidação lipídica. Optou-se por usar carne ao invés de salame por ser um teste inicial.

Este primeiro teste preliminar resultou em um artigo científico (Apêndice C), onde pode-se encontrar os resultados e uma discussão mais aprofundada dos dados obtidos neste experimento. Os resultados mostraram que os sistemas de aplicação e os tempos de exposição testados não influenciavam de maneira significativa os parâmetros avaliados na carne. Com isso, definiu-se para os próximos experimentos o sistema de banho de US, já que a sonicação de salames seria mais homogênea por imersão no banho em comparação à sonda.

- Experimento para avaliar o efeito do tempo de exposição de US sobre a viabilidade dos micro-organismos

Este experimento foi realizado visando principalmente testar tempos maiores de exposição que os usados no primeiro teste e a suscetibilidade das culturas microbianas empregadas na elaboração do salame (*Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus carnosus*). Foi usado banho US (Elma® TI-H 5, Singen, Alemanha; 45 kHz, 500 W) pelos tempos de 0 (controle não sonicado), 1, 5, 10 e 15 min em embutido fermentado similar ao salame. O experimento foi acompanhado ao longo de 30 dias, com análises logo após exposição ao US (dia 0) e após 9 dias e 30 dias, com o produto pronto.

Percebeu-se que o US foi capaz de aumentar a viabilidade das bactérias lácticas (Tabela 1), principalmente com o maior tempo de exposição (15 min). Embora de maneira menos pronunciada, o US também influenciou o crescimento de micro-organismos da família *Micrococcaceae* (Tabela 2). Outros parâmetros analisados não foram afetados de maneira

significativa pelo US, tais como atividade de água, oxidação lipídica (TBARS) e cor do produto (dados não mostrados).

Tabela 1 - Número de colônias de bactérias lácticas (*Pediococcus pentosaceus* + *Pediococcus acidilactici*, log UFC.g⁻¹) em embutido fermentado similar a salame ao longo de 30 dias de produção, submetido em banho de US (45 kHz)

Tempo de sonicação	dia 0	dia 9	dia 30
0 min	6,74 ± 0,15 ^{dC}	8,55 ± 0,06 ^{aA}	7,95 ± 0,06 ^{cB}
1 min	6,79 ± 0,05 ^{dC}	8,62 ± 0,07 ^{aA}	7,87 ± 0,04 ^{cB}
5 min	6,98 ± 0,09 ^{cC}	8,37 ± 0,03 ^{bA}	8,06 ± 0,04 ^{bB}
10 min	7,22 ± 0,06 ^{bC}	8,52 ± 0,08 ^{aA}	7,76 ± 0,08 ^{dB}
15 min	7,61 ± 0,09 ^{aC}	8,52 ± 0,09 ^{aA}	8,19 ± 0,06 ^{aB}

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias obtidas a partir de três amostras independentes (n=3).

Tabela 2 - Número de colônias de *Micrococcaceae* (*Staphylococcus xylosus* + *Staphylococcus carnosus*, log UFC.g⁻¹) em embutido fermentado similar a salame ao longo de 30 dias de produção, submetido em banho de US (45 kHz)

Tempo de sonicação	dia 0	dia 9	dia 30
0 min	6,61 ± 0,08 ^{abA}	6,52 ± 0,11 ^{bcA}	4,74 ± 0,21 ^{bB}
1 min	6,58 ± 0,02 ^{bcA}	6,62 ± 0,05 ^{abA}	4,89 ± 0,11 ^{bB}
5 min	6,47 ± 0,06 ^{cA}	6,39 ± 0,10 ^{cdA}	5,87 ± 0,08 ^{aB}
10 min	6,67 ± 0,10 ^{abA}	6,78 ± 0,08 ^{aA}	5,93 ± 0,03 ^{aB}
15 min	6,72 ± 0,09 ^{aA}	6,26 ± 0,16 ^{dB}	4,80 ± 0,03 ^{bC}

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias obtidas a partir de três amostras independentes (n=3).

- Experimento para definir frequência do US

Como o efeito do US sobre a viabilidade de micro-organismos é dependente de vários fatores (características do micro-organismo, substrato, frequência, amplitude, intensidade, tempo de exposição), foi realizado um terceiro teste em que foram avaliadas duas frequências.

Para o teste foram usados banhos US 45 kHz (Elma® TI-H 5, Singen, Alemanha, 500 W) e 130 kHz (Elma® TI-H 10, Singen, Alemanha, 750 W) em salames tipo Italiano com a mesma formulação que seria usada no experimento final. Os salames foram sonicados por 0 min (controle), 10 min e 20 min em cada frequência. Foram realizadas análises de contagem de bactérias lácticas e *Micrococcaceae*, avaliação instrumental da cor (CIE L*a*b*), pH, atividade de água e oxidação lipídica (TBARS).

Os resultados deste experimento mostraram que o US não afetou o crescimento de bactérias lácticas, mas aumentou significativamente a viabilidade de bactérias da família *Micrococcaceae* e a intensidade de coloração vermelha (parâmetro a* do sistema CIELAB). Os demais parâmetros analisados não foram afetados pelo US em comparação ao controle não sonificado (dados não mostrados).

Tabela 3 - Número de colônias de bactérias lácticas (*Pediococcus pentosaceus* + *Pediococcus acidilactici*, log UFC.g⁻¹) em salames tipo Italianos submetidos ao banho de ultrassom 45 kHz e 130 kHz

Salame	dia 0	dia 2	dia 10	dia 23	dia 45
T1	5,87 ± 0,03 ^{aC}	8,26 ± 0,16 ^{aA}	7,92 ± 0,00 ^{aA}	7,68 ± 0,12 ^{aAB}	6,83 ± 0,00 ^{abC}
T2	5,63 ± 0,03 ^{bC}	7,97 ± 0,01 ^{aA}	7,82 ± 0,16 ^{abA}	7,26 ± 0,01 ^{bB}	7,42 ± 0,01 ^{aB}
T3	5,79 ± 0,04 ^{aD}	7,90 ± 0,02 ^{aA}	8,07 ± 0,04 ^{aA}	7,26 ± 0,01 ^{bB}	6,48 ± 0,04 ^{bC}
T4	5,77 ± 0,02 ^{abD}	8,44 ± 0,37 ^{aA}	7,85 ± 0,00 ^{bA}	7,25 ± 0,02 ^{bB}	6,70 ± 0,00 ^{abC}
T5	5,83 ± 0,03 ^{aC}	8,14 ± 0,14 ^{aA}	7,82 ± 0,07 ^{abB}	7,85 ± 0,12 ^{aB}	6,69 ± 0,39 ^{bC}

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p<0,05). Médias obtidas a partir de três amostras independentes (n=3). T1= controle, não sonificado; T2= 45 kHz/10 min; T3 = 45 kHz/20 min; T4= 130 kHz/10 min; T5= 130 kHz/20 min.

Tabela 4 - Número de colônias de *Micrococcaceae* (*Staphylococcus xylosus* + *Staphylococcus carnosus*, log UFC.g⁻¹) em salames tipo Italiano submetidos ao banho ultrassom 45 kHz e 130 kHz

Salame	dia 0	dia 2	dia 10	dia 23	dia 45
T1	5,01 ± 0,16 ^{bC}	5,40 ± 0,04 ^{aA}	4,96 ± 0,01 ^{bcC}	4,70 ± 0,05 ^{cC}	4,00 ± 0,02 ^{abB}
T2	6,06 ± 0,43 ^{aA}	5,37 ± 0,04 ^{aAC}	5,13 ± 0,08 ^{bcC}	4,71 ± 0,05 ^{cBC}	4,20 ± 0,13 ^{abB}
T3	5,79 ± 0,09 ^{abA}	5,40 ± 0,03 ^{abB}	4,92 ± 0,14 ^{cC}	4,68 ± 0,04 ^{cD}	3,85 ± 0,03 ^{bE}
T4	5,79 ± 0,02 ^{abB}	5,34 ± 0,00 ^{aD}	6,21 ± 0,00 ^{aA}	5,33 ± 0,02 ^{bD}	4,06 ± 0,07 ^{abC}
T5	5,85 ± 0,04 ^{abA}	5,47 ± 0,04 ^{aA}	5,02 ± 0,04 ^{bcB}	5,82 ± 0,14 ^{aA}	4,30 ± 0,16 ^{aC}

Média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Médias obtidas a partir de três amostras independentes ($n=3$). T1= controle, não sonificado; T2= 45 kHz/10 min; T3 = 45 kHz/20 min; T4= 130 kHz/10 min; T5= 130 kHz/20 min.

APÊNDICE B

ARTIGO 1

O ultrassom no amaciamento de carnes

Artigo publicado no periódico Ciência Rural

v.43, n. 8, p. 1522 – 1528, 2013

O ultrassom no amaciamento de carnes

The ultrasound on meat tenderization

Larissa de Lima Alves^{I*} Alexandre José Cichoski^{II} Juliano Smanioto Barin^{II}
Cristine Rampelotto^I Edgar Cesar Durante^{II}

RESUMO

O ultrassom é uma das novas tecnologias limpas aplicadas a alimentos. Na ciência e tecnologia de carnes, é estudado principalmente quanto à sua capacidade de melhorar a maciez da carne, por mecanismos de cavitação. Alguns parâmetros acústicos como frequência, intensidade e tempo de exposição ao tratamento influenciam na tenderização da carne. Os primeiros estudos determinaram que o uso de altas frequências não apresentaram efeitos na textura, em função de não provocarem cavitação. A intensidade de ultrassom que atinge a matriz cárnea também é importante, sendo que, quando aplicada abaixo de 10W cm⁻² ou muito acima desse valor, não se percebe o efeito. O tempo de exposição é dependente da frequência e intensidade utilizadas e influencia diretamente na maciez. Características de qualidade da carne, como perda de peso após cozimento, queda de pH, cor e microbiologia também foram analisados por diversos autores, com dados contraditórios quanto ao efeito do ultrassom sobre esses parâmetros. As particularidades de cada músculo dificultam as comparações de resultados, abrindo espaço para novas pesquisas. O uso de ultrassom na tecnologia de carnes, visando a melhorar a maciez, mostra-se como uma tecnologia promissora, um potencial a ser explorado.

Palavras-chave: carne, cavitação, maciez, tecnologia limpa.

ABSTRACT

Ultrasound is one of the new clean technologies applied to food. In science and technology of meat, is mainly studied for its ability to improve meat tenderness by cavitation mechanisms. Some acoustic parameters such as frequency, intensity and exposure time influence the treatment of meat tenderization. Initial studies determined that the use of high frequencies did not show effects on the texture, due to not cause cavitation. The intensity in which the ultrasound reaches the meat matrix is also important, and when applied below 10W cm⁻² or much above this value does not realize the effect. The exposure time is dependent

on the frequency and the used intensity directly influences the softness. Meat quality characteristics, such as weight loss after cooking, drop in pH, color and microbiology were also analyzed by several authors, with conflicting data on the effect of ultrasound on these parameters. The particularities of each muscle hinder comparisons of results, stimulating new researches. The use of ultrasound technology to improve meat tenderness shows itself as a promising technology with the potential to be exploited.

Key words: cavitation, clean technologies, meat, tenderness.

INTRODUÇÃO

A tecnologia de alimentos é uma ciência dinâmica em constante evolução, em que se busca concomitantemente atender a expectativa dos consumidores por novos sabores e praticidade, e a necessidade da indústria na redução de custos. As técnicas convencionais de processamento e extração vêm sendo substituídas pelas chamadas tecnologias limpas ou verdes, que tipicamente envolvem menos tempo de processamento, menor gasto de água e energia e menor produção de efluentes e substâncias tóxicas (CHEMAT et al., 2011). Dentre as novas tecnologias, destaca-se o uso de fluidos supercríticos, micro-ondas, campos elétricos pulsados, alta pressão hidrostática, luz ultravioleta, luz ultravioleta pulsante, aquecimento ôhmico e ultrassom (LEADLEY & WILLIAMS, 2008).

O ultrassom tem sido explorado desde sua descoberta no começo do século XX para uma

^IPrograma de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: larissafarm@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA), UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

variedade de finalidades na medicina e na indústria química e de engenharia. Com os avanços nos estudos dessa tecnologia e o entendimento de seus mecanismos de ação, surgiu a possibilidade de utilização na área de alimentos. Desde a metade do século passado, o ultrassom vem sendo estudado para finalidades no processamento, preservação e extração de diversas substâncias de alimentos. Diversos estudos têm mostrado, também, sua eficiência nos processos de cozimento, congelamento/descongelamento, cristalização, emulsificação, filtração, moldagem, corte, extração, secagem, desgaseificação, oxidação e maturação em diferentes matrizes alimentares (DOLATOWSKI et al., 2007; LEADLEY & WILLIAMS, 2008; CHEMAT et al., 2011, CÁRCEL et al., 2012; CHANDRAPALA et al., 2012).

Na ciência e tecnologia de carnes, as pesquisas com ultrassom estão focadas, principalmente, na capacidade de provocar mudanças nas propriedades físicas e químicas do músculo, interferindo positivamente na maciez da carne (JAYASOORIYA et al., 2004). A maciez é um atributo de importância na avaliação pelo consumidor e diversas técnicas são utilizadas pela indústria para melhorar essa característica. Estudos mostraram que a suspensão da carcaça pelo osso pélvico durante o resfriamento é mais vantajosa para textura da carne, quando comparada ao método tradicional de suspensão pelo tendão de Aquiles; porém, é pouco utilizada em função de demandar mais espaço e dificultar a circulação de ar na câmara fria (EIKELENBOOM et al., 1998; AHNSTRÖM et al., 2012). A estimulação elétrica é usada nas carcaças antes do resfriamento pós-abate para acelerar a glicólise e adiantar o *rigor mortis*, evitando o encurtamento pelo frio, fenômeno que torna a carne rígida (ORDÓÑEZ, 2005). O uso de enzimas proteolíticas, provindas de plantas, bactérias e fungos, está bem consolidado na literatura; porém, quando usado como solução para imersão da carne, produz excessivo abrandamento superficial, além de odores e sabores desagradáveis. O uso dessas enzimas injetadas no animal vivo poucas horas antes do abate surgiu como alternativa; porém, as enzimas só são ativadas pela temperatura do cozimento, ou seja, no momento da compra, o consumidor não percebe a maciez do produto (PRÄNDL et al., 1994). A injeção de soluções de salmouras, polifosfatos, ácidos e cloretos também auxiliam na melhora da textura, mas afetam a aparência da carne em função do dano causado pelas agulhas (LAWRIE, 2005).

Assim, as técnicas tradicionais de amaciamento possuem algumas desvantagens, abrindo espaço para novas tecnologias. Por ser

uma técnica puramente física, sem necessitar de aquecimento ou reações químicas e apresentar bons resultados, o ultrassom surge como uma alternativa interessante. Dessa forma, o uso do ultrassom na ciência e na tecnologia de carnes é discutido, enfatizando os aspectos mais importantes dos parâmetros acústicos do ultrassom que influenciam na maciez e as consequências da sua aplicação sobre a qualidade global da carne.

O ultrassom

O ultrassom é uma onda mecânica acústica e, como tal, necessita de um meio para se propagar. As ondas acústicas são classificadas tomando a frequência audível pelo ouvido humano, que varia de 20 Hertz (Hz) a 20 kiloHertz (kHz). Frequências abaixo de 20 Hz são referidas como infrassom e acima de 20 kHz como ultrassom (CÁRCEL et al., 2012). O ouvido humano não detecta a onda ultrassônica, enquanto alguns animais como os golfinhos e os morcegos utilizam o ultrassom para localização (AWAD et al., 2012).

As ondas ultrassônicas são classificadas em dois grandes grupos, dependendo da sua frequência e intensidade. Ultrassons de baixa energia são de alta frequência (2-20 Megahertz - MHz) e baixa intensidade ($<1 \text{ W cm}^{-2}$) e não são destrutivos, tendo emprego em técnicas de imagens não invasivas, sensores e análises na medição da composição, maturação, eficácia de emulsificação e concentração ou dispersão de partículas em fluidos (LEADLEY & WILLIAMS, 2008). Na ciência e tecnologia de alimentos, são utilizados em técnicas analíticas para prover informações sobre propriedades físico-químicas, composição, estrutura e estado físico de alimentos. O uso do ultrassom nesses casos apresenta vantagens de ser uma técnica rápida, não invasiva, não destrutiva e precisa (DOLATOWSKI et al., 2007).

Ondas ultrassônicas de alta energia são de baixas frequências (20-100 kHz) e desenvolvem níveis de potência mais altos ($10-1000 \text{ W cm}^{-2}$), com energia suficiente para romper enlaces intermoleculares, sendo que intensidades superiores a 10 W cm^{-2} originam efeitos de cavitação, capazes de modificar algumas propriedades físicas e favorecer reações químicas (PIYASENA et al., 2003; JAYASOORIYA et al., 2004).

O fenômeno de cavitação, responsável por boa parte dos efeitos do ultrassom sobre a matriz alimentar, origina-se quando a onda ultrassônica atravessa um meio líquido, provocando alternância de ondas de compressão (pressão positiva) e rarefação (pressão negativa), produzindo bolhas no

líquido. Durante o ciclo de expansão, ocorre a difusão de gases para o interior da bolha, promovendo sua expansão. No caso da cavitação estável, a oscilação compressão/rarefação é regular e as bolhas induzem microagitação no líquido sem implodir. Na cavitação instável ou transiente, essas bolhas oscilam entre os estados de compressão/rarefação até ocorrer a sua implosão, gerando um aumento de pressão e temperatura localizado e a produção de microjatos que apresentam energia suficiente para desintegrar células e desnaturar enzimas (PIYASENA et al., 2003; CHEMAT et al., 2011, CÁRCEL et al., 2012). O efeito de cavitação é importante no estudo da inativação de microrganismos por provocar afinamento da membrana citoplasmática, aquecimento localizado e produção de radicais livres nocivos aos microrganismos (PIYASENA et al., 2003). Contudo, são necessárias intensidades muito altas de ultrassom para efeito esterilizante efetivo, sendo acoplado a outras técnicas descontaminantes como pressão (manossonicação), calor (termossonicação) ou ambos (manotermossonicação) em estudos recentes (DOLATOWSKI et al., 2007).

O ultrassom é produzido a partir de um transdutor, que converte a energia elétrica em energia mecânica sonora com frequências ultrassônicas. Esses transdutores geralmente são feitos de materiais cerâmicos piezoelétricos, como o titanato zirconato de chumbo (PZT), o titanato de bário e o metaniobato de chumbo. Os sistemas de aplicação de ultrassom mais usados na tecnologia de alimentos são os banhos e as sondas. Os banhos possuem o transdutor unido à base ou às paredes do tanque e a energia ultrassônica é cedida diretamente ao líquido que preenche o recipiente, geralmente a água, que transfere essa energia ao alimento imerso nesse líquido. No sistema de sondas, o sinal acústico é amplificado e dirigido diretamente ao alimento através da haste metálica, sem necessidade de adição de um meio líquido entre alimento e sonda (LEADLEY & WILLIAMS, 2008).

Ultrassom e o amaciamento de carnes

O ultrassom de alta frequência tem seu uso na ciência e tecnologia de carnes baseado na variação de sua velocidade a diferentes temperaturas, em porções magras e gordurosas, podendo ser usado para medir a quantidade de gordura, umidade e proteína de animais vivos e de cortes. Desde a década de 50, o ultrassom é utilizado para inferir o conteúdo de gordura em bovinos vivos. Atualmente, utiliza-se também para identificar datas para abate e prever a qualidade e palatabilidade das carcaças bovinas, suínas e ovinas, além de ser utilizado em técnicas de

análise para determinar a composição físico-química de peixes e frangos (DOLATOWSKI et al., 2007; AWAD et al., 2012).

Contudo, a maioria dos estudos na área de carnes utiliza o ultrassom de baixa frequência, estudando seu efeito na textura. A maciez é um dos principais parâmetros de qualidade da carne e um dos principais problemas da indústria cárnea. A impressão geral da maciez para o paladar inclui a textura e envolve três aspectos. Primeiramente, a facilidade de penetração da carne pelos dentes; em segundo lugar, a facilidade com a qual a carne se fragmenta; e, em terceiro lugar, a quantidade de resíduo que permanece após a mastigação. Inúmeros fatores pré e pós-abate influenciam na maciez, como a espécie, raça, idade, músculo, quantidade de gordura intra e intermuscular, velocidade de queda de pH, exposição a baixas temperaturas (encurtamento pelo frio), condições de cocção, entre outros (LAWRIE, 2005). A maciez é determinada por dois principais componentes do músculo esquelético: o tecido contrátil ou fração miofibrilar (actina, miosina, tropomiosina) e o tecido conjuntivo (colágeno, elastina, reticulina), sendo o primeiro facilmente manipulado pelas técnicas artificiais de amaciamento pós-abate. O tecido conjuntivo é mais difícil de manipular para aumentar a maciez (JAYASOORIYA et al., 2004).

Em condições naturais, a maciez é obtida pela maturação, que ocorre após o *rigor mortis*. Os processos metabólicos da conversão do músculo em carne encerram-se após a conclusão do *rigor mortis* e a carne pronta para o consumo é obtida após certo tempo de armazenamento refrigerado, que pode durar desde dias até semanas. Durante a maturação, enzimas proteolíticas, principalmente as catepsinas e calpaínas, atuam degradando actina, miosina e proteínas da faixa Z. As catepsinas são capazes de hidrolisar as proteínas miofibrilares, inclusive os segmentos peptídicos que resultam dessa hidrólise. Entretanto, as calpaínas são as enzimas que exercem maior efeito sobre o amaciamento, requerendo para sua ativação doses de cálcio na ordem de micromoles (calpaína I) ou milimoles (calpaína II), sendo a primeira a responsável pela maior parte do efeito na textura da carne (PRÄNDL et al., 1994; ORDÓÑEZ, 2005).

O efeito do ultrassom sobre a textura da carne é basicamente devido aos efeitos de cavitação, principalmente cavitação transiente (CHANDRAPALA et al., 2012). A natureza destrutiva da cavitação e a vibração da onda ultrassônica levam ao enfraquecimento da estrutura muscular, com a ruptura das estruturas do colágeno e das miofibrilas (GOT et al., 1999; STADNIK & DOLATOWSKI,

2011). Além disso, a cavitação também causa danos à estrutura de organelas celulares, com a liberação de catepsinas dos lisossomos e de cálcio do retículo sarcoplasmático, o qual ativará o sistema calpaína, acelerando a proteólise (CHANDRAPALA et al., 2012). A atividade enzimática de proteases também poderá ser acelerada pelo aumento de temperatura que ocorre durante a exposição ao ultrassom (DICKENS et al., 1991; CHANDRAPALA et al., 2012). Outra consequência desse aquecimento é a desnaturação proteica, que poderia vir a contribuir com o amaciamento do músculo (JAYASOORIYA et al., 2007).

Para obter efeitos sobre a textura, parâmetros acústicos como frequência, intensidade, duração da exposição e temperatura devem ser considerados, além das características do músculo analisado. Desde os primeiros estudos, busca-se inferir o efeito isolado desses fatores e qual a melhor combinação para o efeito desejado.

A frequência de ultrassom é um dos aspectos mais importantes para o tratamento de carnes. GOT et al. (1999) utilizaram alta frequência (2,6 MHz) com intensidade de 10 W cm^{-2} por 30 segundos para amaciar músculos bovinos na fase de pré e pós *rigor mortis*, sem obter melhora nos parâmetros de maciez considerados. Frequências na ordem de MHz não são capazes de provocar efeitos de cavitação, o que justificou o resultado negativo naquele estudo (PIYASENA et al., 2003). A cavitação ocorre entre 20 e 100 kHz, sendo essa faixa de frequência utilizada para estudos posteriores, que mostraram efetividade na maciez, especialmente entre 20 e 45 kHz (JAYASOORIYA et al., 2007; STADNIK et al., 2008; STADNIK & DOLATOWSKI, 2011).

A intensidade com que o ultrassom atinge o músculo também deve ser considerada. O trabalho de ZAYATAS et al. (1971) é um dos primeiros estudos sobre o uso de ultrassom em matriz cárnea com a finalidade de melhorar a maciez, utilizando baixa intensidade (2 W cm^{-2}) em frequência de 20 kHz. Os autores não verificaram nenhum efeito significativo, sugerindo que intensidades maiores são necessárias. Estudos seguintes que avaliaram baixas intensidades ($<10 \text{ W cm}^{-2}$) também não observaram resultados efetivos. POHLMAN et al. (1997a), ao testarem frequência de 20 kHz e $1,55 \text{ W cm}^{-2}$ de intensidade por 8, 16 ou 24 minutos de exposição à sonda de ultrassom, não observaram efeito sobre a textura nos músculos *Semitendinosus* e *Biceps femoris* em bovinos, avaliada através da medida da força de cisalhamento. Em um segundo estudo, POHLMAN et al. (1997b) utilizaram a mesma frequência (20 kHz),

porém com maior intensidade (22 W cm^{-2}) por 0, 5 ou 10 minutos em músculo bovino *Pectoralis*, sem melhorar a maciez e as características sensoriais e de cozimento. O efeito observado foi atribuído à grande quantidade de colágeno do músculo analisado, que pode ter mascarado o efeito do ultrassom. LYNG et al. (1997) estudaram aplicação de ultrassom com baixas intensidades (30-47 kHz e 0,29-0,62 W cm^{-2} de frequência e intensidades, respectivamente) em banho sobre os músculos *Longissimus*, *Semitendinosus* e *Biceps femoris*, sem obter resultado efetivo sobre amaciamento, solubilidade de colágeno e proteólise miofibrilar. Assim como baixas intensidades não apresentam resultados positivos, a exposição a intensidades maiores (62 W cm^{-2} com 20 kHz de frequência) não foi eficaz, quando aplicada por 30 segundos em músculos bovinos e de cordeiro (LYNG et al., 1998 a,b). Os autores atribuíram o resultado à alta intensidade e ao baixo tempo de exposição utilizados.

O tempo de exposição ao ultrassom também exerce efeito importante quando se busca amaciamento da carne. JAYASOORIYA et al. (2007) avaliaram o efeito do tempo de exposição (0, 30, 60, 120 e 240 segundos) de músculos bovinos *Semitendinosus* e *Longissimus* a uma sonda com frequência de 24 kHz e 12 W cm^{-2} de intensidade, analisando diversos parâmetros como pH, cor, mudanças nas perdas de peso após exposição ao ultrassom e após cozimento, além de avaliar as mudanças de textura provocadas pela sonicação, concluindo que são necessários tempos de exposição ao ultrassom acima de 60 segundos para se ter efeito na tenderização dos músculos. Os autores também relataram que, à medida que o tempo de exposição aumentou, a firmeza da carne reduziu, sem prejudicar os demais parâmetros de qualidade avaliados.

STADNIK et al. (2008) utilizaram banho de ultrassom para acelerar o processo de maturação de músculo bovino *Semimembranosus* à frequência de 45 kHz, na intensidade de 2 W cm^{-2} e exposição por 120 segundos. As amostras sonicadas apresentaram mudanças *post mortem* mais avançadas que o controle não sonicado, com maior capacidade de retenção de água no músculo e maior degradação de proteínas, sendo que os músculos expostos ao ultrassom ficaram mais macios do que os músculos do controle. Em trabalho posterior, foram usados os mesmos parâmetros acústicos (45 kHz, 2 W cm^{-2} , 120 s) e foi constatado que, 48 e 72 horas após o abate, o valor da força de cisalhamento usado para estimar a maciez foi significativamente menor na amostra exposta ao ultrassom. Após 96 horas, os valores obtidos para amostra sonicada e controle

foram similares, ou seja, o ultrassom exerceu efeito sobre a maciez apenas nos três primeiros dias após o abate (STADNIK & DOLATOWSKI, 2011). No trabalho de JAYASOORIYA et al. (2007), os autores observaram efeito do ultrassom até o quinto dia *post-mortem*, sendo que, após 8,5 dias, o efeito foi semelhante ao controle não sonicado. Sendo assim, sugere-se que o ultrassom apenas adianta o processo de maturação natural, reduzindo o tempo necessário para que a carne fique macia.

Além da maciez, outros parâmetros importantes para a qualidade da carne devem ser ponderados quando o músculo é exposto ao ultrassom. Os valores da queda do pH *post-mortem* foram avaliados por alguns autores e os resultados ainda são contraditórios. STADNIK & DOLATOWSKI (2011) não observaram efeito significativo do ultrassom sobre esse parâmetro. JAYASOORIYA et al. (2007) relatam aumento de pH conforme o tempo de exposição ao ultrassom variou de 0 a 240 segundos, atribuindo isso ao fato da cavitação causar danos à célula com liberação de íons no citosol e mudanças na conformação de proteínas que ocultariam grupos acídicos (GOT et al., 1999). A queda de pH é importante em função de estar diretamente ligada à ativação das enzimas proteolíticas calpaínas e catepsinas. O pH ótimo para ação das catepsinas é moderadamente ácido, enquanto das calpaínas é neutro. Desse modo, o aumento de pH aumenta a atividade das calpaínas, as quais têm papel principal na maturação. STADNIK et al. (2008) observaram efeito significativo do ultrassom sobre o pH apenas após 48h *post-mortem*, quando a amostra sonicada apresentou valor de pH significativamente mais alto que o controle, mas semelhante nos tempos de análise de 24, 72 ou 96h *post-mortem*.

As perdas de peso após exposição ao ultrassom e ao cozimento foram medidas por POHLMAN et al. (1997a,b) e por JAYASOORIYA et al. (2007) e nenhum efeito do ultrassom foi observado, quando comparado ao controle não sonicado. STADNIK et al. (2008) avaliaram a capacidade de retenção de água em amostras controle e sonicadas em banho a 45 kHz, 2 W cm⁻² por 120 segundos, e não observaram diferença após 24 ou 48 horas *post-mortem*. Esse é um aspecto positivo, uma vez que o conteúdo de água contribui para as características de suculência da carne.

A cor também é um atributo bastante considerado pelo consumidor no momento da compra. Os parâmetros de cor L* (luminosidade), a* (verde-vermelho) e b* (amarelo-azul) não foram afetados pelo tratamento de ultrassom nos estudos de JAYASOORIYA et al. (2007) e STADNIK &

DOLATOWSKI et al. (2011). CHANG et al. (2012) não observaram efeito do ultrassom sobre L* e a*, mas o parâmetro b* foi significativamente menor que o controle, quando exposto por 30 segundos. Esse efeito foi atribuído à alta frequência utilizada (40 kHz), especialmente quando comparada à frequência testada por JAYASOORIYA et al. (2007) (24 kHz). No primeiro estudo de POHLMAN et al. (1997a), ao usar banho de ultrassom com parâmetros acústicos de 20 kHz, 1,55 W cm⁻² e exposição por 8, 16 ou 24 minutos em músculo bovino *Semitendinosus* e *Biceps femoris*, não foi percebido efeito do ultrassom sobre os parâmetros L*, a* ou b*. Porém, ao manter a frequência de 20 kHz e aumentar a intensidade para 22 W cm⁻² com tempos de 0, 5 ou 10 minutos em músculo *Pectoralis*, os autores relatam maior luminosidade (maior L*), menor intensidade da coloração vermelha (menor a*) e maior intensidade de tonalidade amarela (maior b*), quando o músculo foi exposto ao ultrassom, embora não se tenha percebido diferença entre os tempos de 5 e de 10 minutos, ou seja, o ultrassom afetou os parâmetros de cor, independente do tempo de exposição utilizado (POHLMAN et al., 1997b).

O efeito do ultrassom sobre a flora benéfica, deteriorante e patogênica em carnes ainda é pouco explorado, embora já se saiba que o ultrassom não é efetivo quando utilizado como único tratamento para reduzir a carga microbiana. POHLMAN et al. (1997a) avaliaram o potencial germicida do ultrassom em músculos bovinos, sem observar diferença estatisticamente significativa quando as amostras sonicadas foram comparadas ao controle por 30 dias de armazenamento. Apenas no dia zero foi verificado leve efeito inibitório do ultrassom sobre o número de colônias, mas a diferença entre a amostra sonicada e o controle desapareceu após cinco dias. Desse modo, o ultrassom exerceu apenas impacto imediato sobre o crescimento de microrganismos, sem garantir o efeito ao longo do armazenamento.

Contudo, é difícil comparar dados, em função da variação das características específicas de equipamentos e das peculiaridades intrínsecas de cada músculo estudado. Diversos fatores podem influenciar nos resultados, desde as condições acústicas até as particularidades de cada músculo, já que alguns efeitos do uso do ultrassom na qualidade da carne ainda são contraditórios.

CONCLUSÃO

O ultrassom é uma tecnologia de processamento nova na área de alimentos e com

potencial de ser utilizado na ciência e tecnologia de carnes para auxiliar na obtenção de carnes mais macias, tão desejadas pelo consumidor. Alguns parâmetros acústicos que influenciam na sua efetividade, bem como mecanismos de ação, já foram esclarecidos; contudo, alguns efeitos na qualidade da carne ainda são contraditórios. Sendo assim, o uso do ultrassom na área de carnes carece de mais estudos e deve ser melhor explorado, abrindo espaço para desenvolvimento de novas tecnologias acessórias e o estabelecimento de parâmetros que possam padronizar sua aplicação e tornar seu efeito reprodutível.

REFERÊNCIAS

- AHNSTRÖM, M.L. et al. Effects of pelvic suspension of beef carcasses on quality and physical traits of five muscles from four gender-age groups. **Meat Science**, v.90, n.3, p.528-535, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2138146154&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=b491f6002f93cc5a9ef3a89e14fec58f&searchtype=a>. Acesso em: 12 maio 2012. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.09.003.
- AWAD, T.S. et al. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review. **Food Research International**, v.48, n.2, p.410-427, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137572846&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=e5428dc2c5554a5a20c04d2e764f3e89&searchtype=a>. Acesso em: 14 jun. 2012. doi: 10.1016/j.foodres.2012.05.004.
- CÁRCEL, J.A. et al. Food process innovation through new technologies: use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v.110, n.2, p.200-207, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137575294&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=3432e4d13cc582e966281a89d8411fca&searchtype=a>. Acesso em: 25 maio 2012. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.05.038.
- CHANDRAPALA, J. et al. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.19, n.5, p.975-983, 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137584131&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=e2cb57fa4934d31f3653687a20951bc6&searchtype=a>. Acesso em: 12 jun. 2012. doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.01.010.
- CHANG, H.J. et al. Effects of characteristics changes of collagen on meat physicochemical properties of beef semitendinosus muscle during ultrasonics processing. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, n.1, p.285-297, 2012. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/277055m3766q0641/>>. Acesso em: 20 set. 2012. doi: 10.1007/s11947-009-0269-9.
- CHEMAT, F. et al. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.18, n.4, p.813-835, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137594603&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=9df27fc28877073624287ff72065988d&searchtype=a>. Acesso em: 16 abr. 2012. doi: 10.1016/j.ultsonch.2010.11.023.
- DICKENS, J.A. et al. Effect of ultrasonic irradiation on some physical characteristics of broiler breast muscle and cooked meat. **Poultry Science**, v.70, n.1, p.389-396, 1991. Disponível em: <http://ps.fass.org/search?submit=yes&pubdate_year=&volume=70&firstpage=389&doi=&author1=&author2=&title=&andorexacttitle=&andtitleabstract=&andorexacttitleabs=&andfulltext=&andorexactfulltext=&fmonth=&fyear=&tmonth=&tyear=&format=standard&hits=10&sortspec=relevance&submit=yes&submit=Submit>. Acesso em: 10 out. 2012. doi:10.3382/ps.0700389.
- DOLATOWSKI, Z.J. et al. Applications of ultrasound in food technology. **Technologia Alimentaria**, v.6, n.3, p.89-99, 2007. Disponível em: <http://www.food.actapol.net/pub/8_3_2007.pdf>. Acesso em: 10 set. 2012.
- EIKELENBOOM, G. et al. Effect of pelvic suspension and cooking temperature on the tenderness of electrically stimulated and aged beef, assessed with shear and compressed tests. **Meat Science**, v.49, n.1, p.89-99, 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137600892&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=0da74e409f5a852f047bf1c183719960&searchtype=a>. Acesso em: 12 jun. 2012.
- GOT, F. et al. Effects of high-intensity high frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physico-chemical properties of beef. **Meat Science**, v.51, n.1, p.35-42, 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137606253&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=0319b36127ae877484ac5edebd54ed2f&searchtype=a>. Acesso em: 15 set. 2012.
- JAYASOORIYA, S.D. et al. Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. **International Journal of Food Properties**, v.7, n.2, p.301-319, 2004.
- JAYASOORIYA, S.D. et al. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *Semitendinosus* and *Longissimus* muscles. **Meat Science**, v.75, p.628-639, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137609209&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=b567ada58c32bba04013a4677b6d0d59&searchtype=a>. Acesso em 22 jul. 2012. doi: 10.1016/j.meatsci.2006.09.010.
- LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384p.
- LEADLEY, E.; WILLIAMS, A. Procesado com pulsos electricos, ultrasonidos de potencia y otras tecnologias emergentes. In: BRENNAM, J.G. **Manual del procesado de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2008. Cap.7, p.203-237.
- LYNG, J.G. et al. The influence of high intensity ultrasound bath on aspects of beef tenderness. **Journal of Muscle Foods**, v.8, n.3,

- p.237-249, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4573.1997.tb00630.x/abstract>>. Acesso em: 21 set. 2012. doi: 10.1111/j.1745-4573.1997.tb00630.x.
- LYNG, J.G. et al. The effect on aspects of beef tenderness of pre and post rigor exposure to a high intensity ultrasound probe. **Journal Science of Food and Agriculture**, v.78, n.3, p.308-314, 1998a. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199811\)78:3%3C308::AID-JSFA123%3E3.0.CO;2-F/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0010(199811)78:3%3C308::AID-JSFA123%3E3.0.CO;2-F/abstract)>. Acesso em: 10 out. 2012. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199811)78:3<308::AID-JSFA123>3.0.CO;2-F.
- LYNG, J.G. et al. The effects of pre and post rigor high intensity ultrasound treatment on aspects of lamb tenderness. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.31, n.4, p.334-338, 1998b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643897903613>>. Acesso em: 01 out. 2012. doi: 0023-6438/98/040334.
- ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnología de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280p.
- PIYASENA, P. et al. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.87, p.207-216, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137634184&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=c9768165be503b70cbaab4cc185b49b&searchtype=a>. Acesso em: 27 set. 2012. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00075-8.
- POHLMAN, F.W. et al. The effect of low-intensity ultrasound treatment on shear properties, color stability and shelf-life of vacuum-packaged beef *semitendinosus* and *biceps femoris* muscles. **Meat Science**, v.45, n.3, p.329-337, 1997a. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137635300&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=d1f4b29a693356fee3a57455fce083ba&searchtype=a>. Acesso em: 24 set. 2012.
- POHLMAN, F.W. et al. Effects of high intensity ultrasound treatment, storage time and cooking method on shear, sensory, instrumental color and cooking properties of packaged and unpackaged beef *pectoralis* muscle. **Meat Science**, v.46, n.1, p.89-100, 1997b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137638428&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=9eb85e1bd7af0bd7f4dbfcd8a5e263d&searchtype=a>. Acesso em: 15 set. 2012.
- PRÄNDL, O. et al. **Tecnología e higiene de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 853p.
- STADNIK, J. et al. Effect of ultrasound treatment on water holding properties and microstructure of beef (*M. semimembranosus*) during ageing. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, n.10, p.2151-2158, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=2137638974&_sort=r&_st=13&view=c&_acct=C000067446&_version=1&_urlVersion=0&_userid=5477235&md5=38a567c845654f21d1049cb352e1b8f5&searchtype=a>. Acesso em: 22 set. 2012. doi: 10.1016/j.lwt.2007.12.003.
- STADNIK, J.; DOLATOWSKI, Z.J. Influence of sonication on Warner-Bratzler shear force, colour and myoglobin of beef (*M.semimembranosus*). **European Food Research Technology**, v.233, p.553-559, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00217-011-1550-5>>. Acesso em: 20 set. 2012. doi: 10.1007/s00217-011-1550-5.
- ZAYATAS, Y. Effect of ultrasound on animal tissues. **Myasnaya-Industriya SSSR**, v.42, n.3, p.33-35, 1971.

APÊNDICE C

ARTIGO 2

Effect of ultrasound treatment (bath and probe systems) on physical, chemical and microbiological properties of *Semitendinosus* beef during storage

Artigo submetido ao periódico Journal of Stored Products Research

Effect of ultrasound treatment (bath and probe systems) on physical, chemical and microbiological properties of *Semitendinosus* beef during storage

**Larissa De Lima Alves¹, Cristine Rampelotto¹, Suelem L. Da Silva¹, Marianna S. Silva¹,
Heloísa C. De Moura¹, Edgar C. Durante¹, Renius De O. Mello¹, Cristiano R. De
Menezes¹, Juliano S. Barin¹, Paulo C. B. Campagnol¹, Alexandre J. Cichoski^{1,*}**

Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul,
Brazil

* Corresponding author: Alexandre J. Cichoski

Universidade Federal de Santa Maria. CEP 97105-900. Santa Maria, Rio Grande do Sul,
Brazil, Tel: +55-55-3220-8254; Fax: +55-55-3220-8254. E-mail: cijoale@gmail.com

Abstract

This study was to evaluate the effects of two systems for US application on the physical (Warner Bratzler Shear force - WBS, and color) chemical (pH, lipid oxidation,) and microbiological (mesophilic, lactic acid and psychotropic bacteria) properties of *Semitendinosus* beef during storage (16 days at $7\pm 1^\circ\text{C}$). Samples obtained 48 h *post-mortem* were submitted to US using bath (45 kHz) and probe (20 kHz) in different time (0, 60, 120 or 240 s). After application the samples were vacuum packaged and evaluated during at 0, 3, 5, 9 and 16 days. US reduced WBS force after treatment, but this effect was not maintained during storage. Lipid oxidation and color values did not changed and microbial flora were not damaged by the use of US. Discriminant analysis shows that storage time was the most important factor, while US system and time of exposure presented slightly differences regarding to their effect on meat.

Keywords: ultrasound, meat, sonication, lipid oxidation, texture, microbial safety

1. Introduction

Biochemical processes have an influence on meat tenderization (Lawrie 2005), and it has long been known that tenderness is improved *post-mortem* during the ageing of meat due to the action of proteolytic enzymes as cathepsins and calpains (Lonergan *et al.* 2010; Kemp and Parr 2012). Although calpains could be considered the most important proteases responsible for softening, calcium is required for their activation at micromolar and millimolar concentration for calpain I and calpain II, respectively (Koohmaraie and Geesink 2006). In this way, increased calcium availability could improve *post-mortem* muscle tenderness (Pohlman *et al.* 1997a; Kemp *et al.* 2010). Some methods have been used for this purpose as electrical stimulation (Hwang *et al.* 2003; Barbut 2014) and injection of calcium chloride (Gerelt *et al.* 2002; Bunmee *et al.* 2014). However, these methods have been shown to affect the appearance, color stability and water-holding capacity of meat (van Laak and Smulders 1990; Varnam and Sutherland 1994).

Ultrasound (US) has been used as an alternative technique to promote meat tenderness (Pohlman *et al.* 1997a,b; Got *et al.* 1999; Sikes *et al.* 2014). US refers to sound waves inaudible to the human ear frequency (>20 kHz) (Cárcel *et al.* 2012; Chandrapala *et al.* 2012) and its main effect for meat tenderization is related to the cavitation phenomenon observed generally at lower frequencies (20 to 100 kHz). Cavitation is produced by alternating compression and decompression of media caused by US, thus producing bubbles (Bermúdez-Aguirre *et al.* 2008) that could collapse and generate high energy shear waves and turbulence (Kentish and Ashokkumar 2008). Under US application, a disruption of sub-cellular components (e.g., sarcoplasmic reticulum and mitochondria) could occur, with increased concentration of calcium ions and a subsequent improvement of calpain activity (Alliger 1975; Pohlman *et al.* 1997a; Got *et al.* 1999). In addition, cavitation promotes the release of cathepsin proteases from lysosomes, destroys muscle cell integrity, and could cause selective

heating of collagen, thus reducing meat toughness (Zayas and Garbatow 1978; Stadnik and Dolatowski 2011; Chang *et al.* 2012). Therefore, several papers have been published that investigate the effects of ultrasound on meat tenderization (Pohlman *et al.* 1997 a,b; Got *et al.* 1999; Jayasooriya *et al.* 2004, 2007; Stadnik *et al.* 2008; Stadnik and Dolatowski 2011; Chang *et al.* 2012), but the results obtained were not conclusive. The differences observed in these works could be explained due to the high variation of experimental conditions such as frequency, time, and intensity of US application (Alves *et al.* 2013). US is generally applied using bath or probe systems. In baths, the ultrasonic energy is transferred directly to a liquid that fills the container, usually water, which transfers this energy to the food immersed in this liquid. When probes are used, the acoustic signal is amplified and sent directly to the food (Mason and Peters 2002; Leadley and Willians 2008). However, the amount of energy that is provided by US baths (1-5 W cm⁻²) is generally lower than US probes, which could reach hundreds of W cm⁻² (Mason and Peters 2002). Therefore, the use of different US systems could lead to different effects on meat tenderization, but there is a lack of information about the comparison of bath and probe systems for meat tenderization in literature.

Cavitation also accelerates chemical reactions (Suslick 1989) and could affect the quality of meat as a result of oxidative reactions. Despite the importance of the oxidative process on the sensorial properties of meat, few works about this topic could be found in the literature. Although Chang and Wong (2012) report increased lipid oxidation in cobia sashimi (*Rachycentron canadum*), no information was found about the oxidation effect of US on beef. This lack of information is also observed for the effect of US on microbiota of meat, and both inhibition (Sams and Feria 1991; Piyasena *et al.* 2003) and stimulation (Nguyen *et al.* 2009; Ewe *et al.* 2012; Yeo and Liong 2013) of growth effects have been reported.

The aim of this work is to investigate the effect of two systems of US application (bath at 45 kHz and probe at 20 kHz) on *Semitendinosus* at different exposure times (0, 60, 120 or

240 s). For this purpose, an evaluation of US effect on the storage time of *Semitendinosus* beef ($7 \pm 1^\circ\text{C}$, up to 16 days) was performed. In this way, physical (Warner Bratzler Shear (WBS) force and color), chemical (pH and lipid oxidation), and microbiological (counting mesophilic, lactic acid and psychotropic bacteria) properties of meat were evaluated. A statistical evaluation was carried out using these properties by means of orthogonal contrasts and canonical discriminant analysis in order to identify the differences among treatments.

2. Materials and methods

2.1 Samples and reagents

Semitendinosus beef muscle samples were collected from zebu \times charolais crossbred bull carcasses (2-3 years old, 370-400 kg) slaughtered in a commercial meat processing industry following guidelines recommended in Brazil (Brasil 2000). The samples were excised after 48 h *post-mortem* into blocks (40 \times 60 \times 20 mm of length, width and height, respectively) with around 50 g. The individual samples were vacuum-packaged in polyethylene bags and identified according to ultrasound system treatment (bath (B) or probe (P)) and times of US application (60, 120 or 240 s) to each system. In addition, a control sample without ultrasound application (C) was used. Experiments were replicated twice. All reagents and chemicals were of analytical-reagent grade.

2.2 Ultrasound treatment

For ultrasound application, a bath (Elma[®] TI-H 5, Singen, Germany, 45 kHz, 500 W, 1.8 W cm⁻²) and a probe (VC 750, Sonics and Materials[®], Newtown, EUA, 20 kHz, 750 W, 26.5 W cm⁻²) systems were used. Ultrasound was applied using these systems for 60, 120 or 240 s perpendicularly to muscle fibers. Samples were analyzed immediately after ultrasound

exposure (day 0) or remained stored at $7 \pm 1^\circ\text{C}$ for 3, 5, 9 and 16 days in order to evaluate the effect of storage time.

2.3 pH determination

The pH was determined using a potentiometer (Digimed – DM-22, São Paulo, SP, Brazil) with 5g of homogenized in 50 mL of distilled water (AOAC 2006). Measurements were carried out in triplicate.

2.4 Texture determination

Texture was determined in cooked samples in order to simulate the consumption conditions. One portion of sample in each run was placed in a water bath at 70°C for 45 min within a vacuum-packed polyethylene bag, then cooled with tap water (approximately 25°C) for 30 min and held at 5°C . After, the samples were removed from their plastic bags and dried with paper towel to remove moisture excess before cutting for texture determination (Jayasooriya *et al.* 2007). Each meat sample was cut in a parallel way to the muscle fibers into six parts (10 x 15 mm).

Texture analysis was carried out on TA-XT2 Plus equipment (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) using software Exponent version 6.1.1.0 (Texture Technologies Corp., New York, USA), according to the guidelines of AMSA (1995). Samples were sheared using a V-shaped WBS blade and the force and the peak force (N) to cut them were registered for each piece.

2.5 Lipid oxidation analysis (TBARS)

Lipid oxidation was assessed by an evaluation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), following the methodology described by Raharjo *et al.* (1992) and with modifications proposed by Wang *et al.* (2002), in triplicate. The results were expressed as mg malondialdehyde kg^{-1} (MDA mg kg^{-1}).

2.6 Instrumental color determination

Samples were evaluated for instrumental parameters of color using a Minolta Chroma Meter CR- 300 (Minolta Corp., Ramsey, NJ) with illuminant D65 into six points of surface samples (angle 10°), in triplicate. Before color determination, meat samples were allowed to bloom for at least 30 min at 5°C. Color measurement followed the CIE color convention (1975) with outputs of L* (lightness), a* (redness), and b* (yellowness).

2.7 Microbiological analysis

The external part of the bag was disinfected to prevent contamination of the sample and then the package was opened. Microbiological evaluation was carried out by counting the number of colonies of mesophilic (MESO), lactic acid (LACTIC) and psychotropic (PSY) bacteria following sampling proposed by Silva *et al.* (2001) and the methodology described in guidelines recommended in Brazil (Brasil 2000). Results were expressed as log cfu cm⁻².

2.8 Experimental design and statistical analysis

Statistical analysis was carried out by means of orthogonal contrasts and canonical discriminant analysis in order to identify the differences among treatments.

A completely randomized design with repeated measure in time was adopted, using the MIXED procedure and employing special parametric structure in the matrices of (co)variance as the following statistical model:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + e_{ijk}$$

where Y_{ijk} denotes the measurement in time, k is the j -th repetition assigned to treatment i , $\mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik}$ is the mean for treatment i at time k (containing the fixed effects for treatment, time, and treatment \times time interaction), and e_{ijk} is the random error associated with the measurement at time k in the j -th repetition assigned to treatment i , so that

$\text{Var}[\mathbf{Y}] = \mathbf{I}_k \otimes \Sigma$, where \mathbf{I}_k is an identity matrix of a dimension equal to the number of replicates, and Σ is the matrix of (co)variance due to residue obtaining several measurements of the same experimental unit j . The structures of (co)variance of the errors ε_{ijk} tested were VC, CS, CSH, UN, AR (1), ARH (1), ARMA (1,1), TOEP, TOEPH, ANTE (1), and HF. The (co)variance and the solutions for the fixed effects were estimated by restricted maximum residual likelihood method and the number of degrees of freedom of the denominator for the F test was calculated by Kenward-Rogers's method.

An analysis of orthogonal contrasts was used to assess differences among treatments and for trends between the shelf life from the coefficients of the orthogonal polynomials for interpolating estimated by the Interactive Matrix Language procedure. Means were adjusted by the least square method with LSMEANS command and compared using the Tukey test.

Multivariate analysis of variance was performed with MANOVA command, complemented by canonical discriminant technique with CANDISC procedure (Khattree and Naik 2000), completely randomized disregarding the factorial arrangement, as in the following statistical model:

$$Y_{ijk} = \mu_k + \alpha_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

where Y_{ijk} is the observed value of k -th variable under the i -th treatment in the j -th repetition,

μ_k is the overall mean of the k -th variable, α_{ik} is the effect of the i -th treatment in the k -th variable, and ε_{ijk} is the random effect associated with the ijk observation supposed in

$$\varepsilon_{ijk} \stackrel{\text{iid}}{\sim} N(0, \sigma^2).$$

For this, \mathbf{T} , \mathbf{H} , and \mathbf{E} are, respectively, matrices of sums of squares and total treatments and residues were obtained. Then the Wilks test was performed to test the

hypothesis that the vectors of means of treatments were zero ($H_0: \bar{\mu}_1 = \bar{\mu}_2 = \dots = \bar{\mu}_t$), as follows:

$$\Lambda = \frac{|E|}{|H + E|}$$

where $|E|$ is the determinant of the residual sum of the square and product matrix E , and $|H + E|$ is the determinant of the matrix $H + E$, H being the matrix of the sum of the squares and associated products to the hypothesis in question.

From the multivariate analysis, the eigenvalues were calculated in order to determine the characteristic roots of the following equation (Harris 1975):

$$|E^{-1}H - \lambda_j I| = 0$$

where E^{-1} is the inverse of the common matrix of the sum of the squares and waste products, H is the matrix of the sum of the squares and products related to treatments, λ_j is the j -th eigenvalue of the matrix $E^{-1}H$, and I is the identity matrix of order k .

Afterwards, we estimated the eigenvectors associated with the eigenvalues for the solution of the linear system as a constraint:

$$\bar{z}'_j \frac{E}{n_e} \bar{z}_j = 1$$

where \bar{z}_j is the j -th eigenvector (canonical vector) associated with each eigenvalue λ_j , \bar{z}'_j is the transpose of the j -th canonical vector, E is the matrix of the sum of the squares and residual products, and n_e is the number of degrees of freedom of residue.

Biplot graphics (scores and loadings) were prepared following the work of Lipkovich and Smith (2002), using scaling JK (RMP). All statistical analyses were performed using SAS[®] software - Statistical Analysis System version 9.4 (2008) at 5% level of significance.

3 Results and discussion

3.1 pH

An interaction between treatment \times storage time was observed for pH (Table 1), which presented values that differed ($P < 0.05$) between control \times sonicated samples throughout shelf life. Moreover, the sonication (bath \times probe) system also presented an influence ($P < 0.05$) in pH along shelf life.

The initial pH value on day 0 for the control sample (5.4, Table 2) indicated a *rigor mortis* process of muscle used in the experiment (Lawrie 2005), whereas after US application samples reached *post rigor mortis* and became susceptible to proteolytic enzyme softening.

Sonicated samples presented higher pH than the control at day 0, probably due to cell structure damage from ion released into the cytosol and changes in the conformation of proteins with concealment of acidic groups (Got *et al.* 1999; Jayasooriya *et al.* 2007). For samples on days 3 and 5 of storage, the pH increase in sonicated samples remained higher than in the control. The pH increase in the *post rigor mortis* phase is typical of the aging process, resulting in the release of peptides and basic amino acids from proteolysis, sodium, and calcium from the sarcoplasmic reticulum (Prändl *et al.* 1994). However, a reduction of pH was observed on day 9, and is related to the growth of lactic bacteria (Fig. 1b). Caraveo *et al.* (2014) observed the same tendency when US was used in *Semitendinosus* beef (bath 40 kHz, 11 W cm⁻² for 0, 60 or 90 min) during storage from day 0 until day 10 at 4°C.

Jayasooriya *et al.* (2007) report similar results of pH behavior in *Semitendinosus* and *Longissimus* bovine muscles treated with US (probe 24 kHz for 60, 120 and 240 s), whereas

other studies have found no significant effect of US on pH (Stadnik and Dolatowski 2011; Chang and Wong 2012).

3.2 WBS force

Significant interaction between treatment \times storage time was observed for WBS force (Table 1), with differences between control \times US ($P = 0.0001$) and bath \times probe systems ($P < 0.05$).

Except for P60, the US significantly reduced WBS force on day 0 ($P < 0.05$). The destructive nature of cavitation and turbulence in water media could lead the muscular structures to relax, resulting in fragmentation of myofibrils (Got *et al.* 1999; Ahmad and Hasnain 2013). In addition to rupturing the membranes of mitochondria and sarcoplasmic reticulum, US could increase the release of calcium, which activates the calpain proteolytic enzymes present in the sarcoplasm (Alliger 1975; Lyng *et al.* 1998). These enzymes have been recognized as primarily responsible for the maturation of meat for acting in certain myofibrillar proteins (nebulin, titin, troponin and desmin), but without acting on actin and myosin (Kemp and Parr 2012). The calpains have a maximum activity at pH close to neutrality (Koochmaraie and Geesink 2006; Lonergan *et al.* 2010) and are present in large quantities in *Semitendinosus* beef (Lawrie 2005). As mentioned previously, the sonicated samples showed higher pH than the control on day 0, which may have favored the enzymatic action. Dransfield (1993) states that when close to pH 6.1, calcium reaches its maximum concentration and initiates activation of calpain.

In addition to action on calpain, cavitation could improved the activity of other enzymes related to the softening of meat, such as cathepsins, which could be released by weakening and rupturing membranes from the lysosomes where they are stored (Got *et al.* 1999). Xiong *et al.* (2012) and Chen *et al.* (2015) also report a positive effect of US systems on caspase proteases, recently associated with *post-mortem* tenderization (Lonergan *et al.*

2010). The US may also have an effect on the increase of sarcomere length after its application, which may have contributed to the softness of samples after sonication at day 0 (Got *et al.* 1999).

Stadnik and Dolatowski (2011) observed a significant reduction in shear force 48h and 72h *post-mortem* when using an US bath (45 kHz) for 120 s in bovine *Semimembranosus* muscle. Chang *et al.* (2012) also report the positive effect of using an US bath (40 kHz) for 10, 20, 30, 40, 50 or 60 min on the hardness of bovine *Semitendinosus* muscle, where collagen fibers were disorganized and weakened proportional to exposure time.

Nevertheless, the response of US on the texture did not persist after the third day of storage, so from this point the results of WBS force were similar to those of the control. Jayasooriya *et al.* (2007) also found that the use of US probe (24 kHz, 12 W cm⁻² for 60s, 120s and 240s) had no effect on *Semitendinosus* and *Longissimus* bovine muscle on WBS force during storage for 8.5 days. Stadnik and Dolatowski (2011) observed the effect of US on shear force was perceived only 48h and 72h *post-mortem*, indicating that the US promotes a positive effect on the texture of meat after its application, but that this effect did not remain during storage. This could have occurred because the cavitation allowed the formation of pores in the mitochondrial membrane, since sarcoplasmic reticulum and lysosomes are opened temporarily and reversibly, returning to normal permeability minutes or hours after exposure to the US (Nguyen *et al.* 2009; Yeo and Liong 2013). Furthermore, the effect of proteinases upon US is limited since after a few days they undergo autolysis (Lonergan *et al.* 2010). *Semitendinosus* is a muscle that has naturally increased softness after four days of storage (Lawrie 2005), which may contribute to an explanation of the tenderness of the control in comparison with the sonicated samples during storage. The type of plastic packaging used and the large amount of collagen muscle may have influenced by hindering the penetration of waves and prolonged action of the US (Pohlman *et al.* 1997a).

3.3 TBARS

Interaction treatment \times storage time ($P < 0.0001$) was observed for TBARS values, with differences between the US and control samples ($P < 0.0001$), independent of US system (bath \times probe, $P > 0.05$).

The increase in temperature caused by sonication yields hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) and peroxide (H_2O_2) (Kentish and Ashokkumar 2008) that can oxidize unsaturated fatty acids in meat. Although the use of US affected TBARS more than the control ($P < 0.0001$), the values were below the threshold for detection of unpleasant odor in beef. According to Melton (1983), TBARS values over $0.3 \text{ mg MDA kg}^{-1}$ are needed for this change, while Connell (1990) indicates that odor is only modified above 2 mg MDA kg^{-1} . Chang and Wong (2012) observed an increase in TBARS content in cobia sashimi (*Rachycentron canadum*) exposed to an US bath (60 kHz, 0 to 90 min), but likewise the values were below the detection limits for unpleasant odor. Ashokkumar *et al.* (2008) evaluated the effect of frequency (20 kHz, 358 kHz and 1062 kHz) on the formation of hydroxyl radicals and its impact on phenolic substrate radicals, noting that for 20 kHz oxidative reactions were minimal because transient cavitation bubbles are less active for sonolysis in this frequency. As a result, the frequencies tested (bath 45 kHz and probe 20 kHz) could have been underpowered to provide significant change in lipid oxidation. Furthermore, the vacuum packaging contributes to the oxidative stability by lack of oxygen to the reaction.

3.4 Color

Interaction effect of treatment \times storage time was significant ($P < 0.05$) to color parameters L^* (lightness) and a^* (redness) (Table 1). Application of ultrasound (control \times sonicated) affected only L^* , while system (bath \times probe) was significant only to a^* .

Ultrasound application increased L^* value (Table 3) in sonicated samples at day 0, due to the heating caused by sonication that promotes denaturation of myoglobin and hemoglobin

pigments with an increase on L* (Paniwnyk 2014). Caraveo *et al.* (2014) observed the same tendency when using US in *Semitendinosus* beef (bath 40 kHz, 0, 60 or 90 min).

Denaturation of myoglobin and hemoglobin directly affects the reddish color of meat, thus reducing a* (Pohlman *et al.* 1997b). It was possible to detect the difference between bath × probe (Table 1) samples because samples treated with US probe are generally less a* than samples treated in bath samples or the control as a result of the higher energy intensity of probe compared with bath (Mason and Peters 2002). Parameter b* showed a difference between bath and probe (P<0.05, Table 1) since samples treated with probe generally presented lower b* values (Table 3).

Pohlman *et al.* (1997b) report similar behavior to L*, a* and b* in *Pectoralis* bovine when using an US bath at 20 kHz with intensity (22 W cm⁻²) and time of exposure higher (0, 5 or 10 min) than the present study. By reducing the intensity to 1.55 W cm⁻² and using the same bath for 8, 16 or 24 min, the authors observed no significant effect on the parameters of color (L*, a* and b*) (Pohlman *et al.* 1997a); the same was the case for Stadnik and Dolatowski (2011) and Sikes *et al.* (2014) after ultrasound interventions on beef.

3.5 Microbiological analysis

Treatment × storage time (P<0.05, Table 1) had significant interaction effects on the three groups regarding the microorganism content of the evaluated samples (mesophilic, lactic bacteria and psychotropic). Application of ultrasound (control × sonicated) had no significant effect (P> 0.05) on any of the groups of microorganisms. System (bath × probe) was significant (P<0.05) only for mesophilic and lactic acid bacteria (P <0.05, Table 1).

US is generally associated with its deleterious effect on microorganisms (Piyasena *et al.* 2003), although some studies have shown that it can be used to stimulate the growth of fermentative microorganisms (Wang and Sakakibara 1997; Nguyen *et al.* 2009; Ewe *et al.* 2012). However, the use of US on the microbiology of meat remains underexplored.

Caraveo *et al.* (2014) show that the application of US decreased mesophilic and psychrophilic bacteria in *Semitendinosus* beef stored at 4°C for 10 days; nevertheless, time of US exposure was higher (60 or 90 min). Cichoski *et al.* (2015) show that the application of US the 25 kHz in bath decreased mesophilic and lactic bacteria in sausages stored at 15°C for 60 days with time of US exposure was low (10.53 min at 74°C). Moreover, Pohlmann *et al.* (1997a) and Sams and Feria (1991) found no significant influence of application of US in beef and chicken thigh. The lack of effect of sonication here could be caused due to the temporary effect of US on the growth of microorganisms, which decrease soon after exposure (Ewe *et al.* 2012; Yeo and Liong 2013). However, the low sonication time carried out or even the mild conditions of temperature or pressure used in the experiments could also have influence on this behaviour.

In order to verify the microbiological quality of meat, a total count of mesophilic microorganisms was performed, as evidenced by the low number of colonies of control and other samples at day zero, as well as throughout the experiment (Fig. 1a). Signs of deterioration of the meat, especially smell, are only detected at concentrations above 6 log cfu g⁻¹ (Dainty and Mackey 1992), and therefore until the 16th day of storage no evidences of deterioration were observed, probably due to the low count (≤ 2 log cfu cm⁻²) of microorganisms in the samples. The temperature of 7±1°C during storage and vacuum packaging could extend the validity period of beef for up to 21 days (Blixt and Borch 2002) and certainly contributed to maintain the microbiological quality of the samples.

However, vacuum packaging promotes anaerobiosis, which generally favors the development of lactic acid bacteria associated with the release of acid flavor (Lawrie 2005). Li *et al.* (2013) observed a significant increase in lactic acid bacteria on vacuum-packed beef for 14 days compared with permeable packaging. In our study, the number of colonies of lactic acid bacteria increased throughout the storage time, but low count values (≤ 2 log CFU

cm⁻²) until the 16th day (Fig. 1b) were observed. A significant difference between US systems (bath × probe, Table 1) was observed with values slightly higher for samples treated in baths.

Cold storage encourages proliferation of psychotropic microorganisms, especially *Pseudomonas*. As expected, the number of psychotropic colonies increased during storage for all samples, although remained low (Fig. 1c). Fernández-López *et al.* (2008) and Lorenzo and Gómez (2012) report a significant inhibitory effect of vacuum packaging on the number of colonies of psychotropic and *Pseudomonas* when compared with those exposed to air, so packaging used may have contributed to the good quality of refrigerated samples. Psychotropic counts above 6 log cfu g⁻¹ are indicative of causing an unpleasant odor and above 7 log cfu g⁻¹ result in the appearance of slime on the surface of the meat (Jay 2005), far from the values observed after 16 days of refrigerated storage in this work.

3.6 Canonical discriminant analysis

For a deep insight into the differences between treatments, the canonical discriminant technique was used (Fig. 2). Analysis of the two functions together explained 83% of variance of the data, with the first function (Canonical 1) responsible for the majority of the variation (65.9%). There was formation of the three groups, separated according to storage time. Samples from day 0 were distinct from the group of days 3 and 5 as well as the group of days 9 and 16. The first function discriminated expressively samples analyzed on day 0 in comparison with samples on days 9 and 16, mainly by microbiological evaluation of mesophilic, lactic acid bacteria, and psychotropic. This result was expected, since the counts increased from day 0 to day 16. Days 3 and 5 are mainly distinguished from the others by TBARS and pH, since these days experienced the highest values for both variables (Table 2). It is observed that control days 0, 3 and 5 (C-0, C-3 and C-5, respectively) are slightly apart from the other samples relating to the day of analysis, suggesting that US may have primarily influenced the beginning of storage for some variables. The system (bath/probe) and time of

exposure to US had no influence on grouping, as well as WBS force and parameters of color (L^* , a^* and b^*).

4. Conclusion

Ultrasound treatment applied (probe 20 kHz and bath 45 kHz during 60, 120 and 240 second) significantly reduced the WBS force of meat after application when compared with untreated meat. However, this effect was not maintained during storage, suggesting that ultrasound can only be used to advance the ripening of meat. Other quality parameters such as color, lipid oxidation and microbial flora were not influenced by ultrasound treatments (probe 20 kHz and bath 45 kHz during 60, 120 and 240 second). In general, under the conditions studied, storage time was the most important factor for all parameters evaluated, while a few differences among application system (bath or probe) and time of US application were observed. Therefore, the results suggested that for improvement of US effect on meat the application should be performed not only before packaging, but also during storage.

Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) for supporting this study and also Federal University of Santa Maria (UFSM).

References

- AHMAD, R. and HASNAIN, A. 2013. Ultrasonication of chicken natural actomyosin: effect on ATPase activity, turbidity and SDS-PAGE profiles at different protein concentrations. *Am. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 240-247.
- ALLIGER, H. 1975. Ultrasonic disruption. *Am. Lab.* 10, 75-85.

- ALVES, L.L., CICHOSKI, A.J., BARIN, J.S., RAMPELOTTO, C. and DURANTE, E.C. 2013. O ultrassom no amaciamento de carnes. *Ciência Rural* 43,1522 – 1528.
- AMSA - AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. 1995. *Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of fresh meat*. National Live Stock and Meat Board, Chicago.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. 2006. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 18th ed., Washington, DC.
- ASHOKKUMAR, M., SUNARTIO, D., KENTISH, S., MAWSON, R., SIMONS, L. and VILKHU, K. 2008. Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* 9, 155-160.
- BARBUT, S. 2014. Review: automation and meat quality – global challenges. *Meat Sci.* 96, 335-345.
- BERMÚDEZ-AGUIRRE, D., MOBBS, T.M. and BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. 2008. In: *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (H. Feng, G.V. Barbosa-Cánovas and J. Weiss, eds), Springer, New York.
- BLIXT, Y. and BORCH, E. 2002. Comparasion of shelf life of vacuum-packed pork and beef. *Meat Sci.* 60, 371-378.
- BRASIL. 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. *Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água*. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de agosto de 2003.
- BRASIL. 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 17 de janeiro de 2000. *Regulamento Técnico de métodos de insensibilização para animais de açougue*. Diário Oficial da União, 24 de janeiro de 2000.

- BUNMEE, T., JATURASITHA, S., KREUZER, M. and WICKE, M. 2014. Can calcium chloride injection facilitate the ageing-derived improvement in the quality of meat from culled dairy cows? *Meat Sci.* *96*, 1440-1445.
- CARAVEO, O., ALARCON-ROJO, A.D., RENTERIA, A., SANTELLANO, E. and PANIWNKY, L. 2014. Physicochemical and microbiological characteristics of beef treated with high-intensity ultrasound and stored at 4 °C. *J. Sci. Food Agric.* doi: 10.1002/jsfa.6979.
- CÁRCEL, J.A., BENEDITO, J., BON, J. and MULLET, A. 2012. A food process innovation through new technologies: use of ultrasound. *J. Food Eng.* *110*, 200-207.
- CHANDRAPALA, J., OLIVER, C., KENTISH, S. and ASHOKKUMAR, M. 2012. Ultrasonics in food processing. *Ultras. Sonochem.* *19*, 975-983.
- CHANG, H. and WONG, R. 2012. Textural and biochemical properties of cobia (*Rachycentron canadum*) sashimi tenderized with the ultrasonic water bath. *Food Chem.* *132*, 1340-1345.
- CHANG, H., XU, X., ZHOU, G., LI, C. and HUANG, M. 2012. Effects of characteristics changes of collagen on meat physicochemical properties of beef semitendinosus muscle during ultrasonics processing. *Food and Bioprocess Technol.* *5*, 285-297.
- CHEN, L., FENG, X., ZHANG, Y., LIU, X., ZHANG, W., LI, C., ULLAH, N., XU, X. and ZHOU, G. 2015. Effects of ultrasonic processing on caspase-3, calpain expression and myofibrillar structure of chicken during post-mortem aging. *Food Chem.* *177*, 280-287.
- CICHOSKI, A.J., RAMPELLOTO, C., SILVA, M.S., DE MOURA, H.C., TERRA, N.N., WAGNER, R., DE MENEZES, C.R., FLORES, E.M.M. and BARIN, J.S. 2015. Ultrasound-assisted post-packaging pasteurization of sausages. *Innovative Food science and Emerging Technologies.* *30*, 132-137.
- CIE. 1975. *Colours of light signals*. 2nd edition. Commission Internationale de l'Eclairage, Paris.

- CONNELL, J.J. 1990. Methods of assessing and selecting for quality. In: *Control of fish quality* (J.J. Connel, ed). 3rd ed, Springer, Berlin.
- DAINTY, R.H. and MACKEY, B.M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol.* 73, 103-114.
- DRANSIELD, E. 1993. Modelling post-mortem tenderization-IV: role of calpains and calpastatin in conditioning. *Meat Sci.* 34, 217–234.
- EWE, J., WAN-ABDULLAH, W., ALIAS, A.K. and LIONG, M. 2012. Effects of ultrasound on growth, bioconversion of isoflavones and probiotics properties of parent and subsequent passages of *Lactobacillus fermentum* BT 8633 in biotin-supplemented soymilk. *Ultrason. Sonochem.* 19, 890-900.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., SAYAS-BARBERÁ, E., MUÑOZ, T., SENDRA, E., NAVARRO, C. and PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. 2008. Effect of packing conditions on shelf-life on ostrich steaks. *Meat Sci.* 78, 143-152.
- GOT, F., CULIOLI, J., BERGE, P., VIGNON, X., ASTRUC, T., QUIDEAU, J.M. and LETHIECQ, M. 1999. Effects of high-intensity high frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physic-chemical properties of beef. *Meat Sci.* 51, 35-42.
- HARRIS, R.J. 1975. *A primer of multivariate statistics*. Academic Press, New York.
- HWANG, I.H., DEVINE, C.E. and HOPKINS, D.L. 2003. The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness. *Meat Sci.* 65, 677-691.
- JAY, J. 2005. *Microbiologia de alimentos*. 6th ed, Artmed, Porto Alegre.
- JAYASOORIYA, S.D., BHANDARI, B.R., TORLEY, P. and D'ARCY, B.R. 2004. Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. *Int. J. Food Prop.* 7, 301–319.

- JAYASOORIYA, S.D., TORLEY, P.J., D'ARCY, B.R. and BHANDARI, B.R. 2007. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine semitendinosus and longissimus muscles. *Meat Sci.* 75, 628–639.
- KEMP, C.M., SENSKY, P.L., BARDSLEY, R.G., BUTTERY, P.J. and PARR, T. 2010. Tenderness - an enzymatic view. *Meat Sci.* 84, 248-256.
- KEMP, C.M. and PARR, T. 2012. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. *Meat Sci.* 92, 252-259.
- KENTISH, S. and ASHOKKUMAR, M. 2008. In: *Ultrasound technologies for food and bioprocessing* (H. Feng, G.V. Barbosa-Cánovas and J. Weiss, eds). Springer, New York.
- KHATTREE, R. and NAIK, D.N. 2000. *Multivariate data reduction and discrimination with SAS Software*. SAS Institute, North Carolina.
- KOOHAMARAIE, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci.* 43, S193-S201.
- KOOHMARAIE, M. and GEESINK, G.H. 2006. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Sci.* 74, 34-43.
- LAWRIE, R.A. 2005. *Ciência da carne*. Artmed, São Paulo.
- LEADLEY, E. and WILLIAMS, A. 2008. Procesado com pulsos electricos, ultrasonidos de potencia y otras tecnologias emergentes. In: *Manual del procesado de los alimentos* (J.G. Brennam, ed), Acribia, Zaragoza.
- LI, X., BABOL, J., WALLBY, A. and LUNDSTRÖM, K. 2013. Meat quality, microbiological status and consumer preference of beef *gluteus medius* aged in a dry ageing bag or vacuum. *Meat Sci.* 95, 229-234.
- LIPKOVICH, I. and SMITH, E.P. 2002. Biplot and singular value decomposition macros for Excel. *J. Statistical Soft.* 7, 1-15.

- LONERGAN, E.H., ZHANG, W. and LONERGAN, S.M. 2010. Biochemistry of postmortem muscle – lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Sci.* 86, 184-195.
- LORENZO, J.M. and GÓMEZ, M. 2012. Shelf life of fresh foal meat under MAP, overwrap and vacuum packaging conditions. *Meat Sci.* 92, 610-618.
- LYNG, J.G., ALLEN, P. and MCKENNA, B.M. 1998. The effect on aspects of beef tenderness of pre- and post-rigor exposure to a high intensity ultrasound probe. *J. Sci. Food Agric.*, 78, 38-314.
- MASON, T.J. and PETERS, D. 2002. *Practical Sonochemistry*. Woodhead Publishing, Philadelphia.
- MELTON, S.L. 1983. Methodology for following lipid oxidation on muscle foods. *Food Technol.* 37, 105-116.
- NGUYEN, T.M.P., LEE, Y.K. and ZHOU, W. 2009. Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. *Int. Dairy J.* 19, 410-416.
- PIYASENA, P., MOHAREB, E. and MCKELLAR, R.C. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 207-216.
- POHLMAN, F.W., DIKEMAN, M.E. and KROPF, D.H. 1997a. Effects of high intensity ultrasound treatment, storage time and cooking method on shear, sensory, instrumental color and cooking properties of packaged and unpackaged beef *pectoralis* muscle. *Meat Sci.* 46, 89–100.
- POHLMAN, F.W., DIKEMAN, M.E. and ZAYAS, J.F. 1997b. The effect of low intensity ultrasound treatment on shear properties, color stability and shelf life of vacuum packaged beef *semitendinosus* and *biceps femoris* muscles. *Meat Sci.* 45, 329–337.
- PRÄNDL, O., FISHER, A., SCHIMIDHOFER, T. and JURGGEN-SINNEL, H. 1994. *Tecnología e higiene de la carne*. Acribia, Zaragoza.

- RAHARJO, S., SOFOS, J.N. and SCHMIDT, G.R. 1992. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C18 method for measuring lipid peroxidation in beef. *J. Agric. Food Chem.* *40*, 2182-2185.
- SAMS, A.R. and FERIA, R. 1991. Microbial effects of ultrasonication of broiler drumstick skin. *J. Food Sci.* *56*, 247-248.
- SAS. 2008. SAS/STAT user's guide. Release 9.4. Statistical analysis system. US:SAS Institute, Inc Cary, NC.
- SIKES, A.L., MAWSON, R., STARK, J. and WARNER, R. 2014. Quality properties of pre- and post-rigor beef muscle after interventions with high frequency ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* *21*, 2138-2143.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A. and SILVEIRA, N.F.A. 2001. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. 2nd ed, Varela, São Paulo.
- STADNIK, J. and DOLATOWSKI, Z.J. 2011. Influence of sonication on Warner-Bratzler shear force, colour and myoglobin of beef (*M.semimembranosus*). *Eur. Food Res. Technol.* *233*, 553-559.
- STADNIK, J., DOLATOWSKI, Z.J. and BARANOWSKA, H.M. 2008. Effect of ultrasound treatment on water holding properties and microstructure of beef (*m. semimembranosus*) during ageing. *LWT Food Sci. Technol.* *41*, 2151–2158.
- SUSLICK, K.S. 1989. The chemical effects of ultrasound. *Sci. Am.* *1*, 80-86.
- VAN LAAK, H.L.J. and SMULDERS, F.J.M. 1990. Colour stability of bovine *longissimus dorsi* and *psoas major* muscle as affected by electrical stimulation and hot bonning. *Meat Sci.* *28*, 211–221.
- VARNAM, A.H. and SUTHERLAND, J.P. 1994. *Carne y productos cárnicos*. Acribia, Zaragoza.

- WANG, B., PACE, R.D., DESSAI, A.P., BOVELL-BENJAMIN, A. and PHILLIPS, B. 2002. Modified extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values in meat with increased specificity and simplicity. *J. Food Sci.* 67, 2833-2836.
- WANG, D. and SAKAKIBARA, M. 1997. Lactose hydrolysis and β -galactosidase activity in sonicated fermentation with *Lactobacillus* strains. *Ultrason. Sonochem.* 4, 255-261.
- XIONG, G., ZHANG, L., ZHANG, W. and WU, J. 2012. Influence of ultrasound and proteolytic enzyme inhibitors on muscle degradation, tenderness and cooking loss of hens during aging. *Czech J. Food Sci.* 30, 195-205.
- YEO, S. and LIONG, M. 2013. Effect of ultrasound on bioconversion of isoflavones and probiotics properties of parent organisms and subsequent passages of *Lactobacillus*. *LWT Food Sci. Technol.* 51, 289 – 295.
- ZAYAS, J.F. and GARBATOW, W.M. 1978. Use of ultrasonics in meat technology. *Fleischwirtschaft* 6, 1009–1012.

Table 1. Probability values for orthogonal contrasts

	Effect of interaction / Variable	pH	WBS	TBARS	L*	a*	b*	Meso	Lactic	Psy
p value	Treatment	<0.0001	0.0086	0.0010	<0.0001	<0.0001	0.0011	0.0022	<0.0001	<0.0001
	Storage time	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0063	0.0003	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Treatment*storage time	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0671	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Orthogonal contrasts	Control × Sonicated	<0.0001	0.0570	0.0703	0.0027	0.0117	0.0882	0.0045	0.0040	0.0954
	Bath × Probe	0.9484	0.1637	0.0027	0.1250	<0.0001	0.0002	0.0006	<0.0001	<0.0001
	Bath: 60-120 s × 240 s	<0.0001	0.0026	0.8871	0.0979	0.0002	0.9173	0.3100	0.0762	0.0062
	Bath: 60 s × 120 s	0.0002	0.7098	0.1874	0.4300	0.0002	0.0531	0.2065	0.2707	0.0791
	Probe: 60-120 s × 240 s	<0.0001	0.1522	0.0027	<0.0001	0.0119	0.2364	0.8615	0.0993	0.1747
	Probe: 60 s × 120 s	0.1594	0.0768	0.0444	<0.0001	<0.0001	0.0305	0.1990	0.0074	0.8860
Orthogonal polynomial contrasts for shelf life	Storage time: Linear	<0.0001	<0.0001	0.0001	0.5868	0.0709	0.0004	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Storage time: Quadratic	<0.0001	0.0016	0.3857	0.0001	0.0449	0.0016	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Orthogonal polynomial contrasts	d=0 vs d=16 × control × sonicated	0.0030	0.0001	<0.0001	<0.0001	0.7089	0.3479	0.7340	0.8368	0.9150
	d=0 vs d=16 × bath × probe	0.0014	0.0002	0.2405	0.1793	0.0368	0.1949	0.0287	0.0277	0.3019
	d=0 vs d=16 × B60-120 s × B240	0.2297	<0.0001	0.1318	0.0059	0.7514	0.8742	0.0481	0.5288	0.7986
	d=0 vs d=16 × B60 × B120	0.0045	0.4352	0.0002	0.0561	0.0014	0.3994	0.9848	0.3475	0.4375
	d=0 vs d=16 × P60-120 × P240	0.0008	0.0113	<0.0001	<0.0001	0.0051	0.7679	0.5765	0.1604	0.4060
	d=0 vs d=16 × P60 × P120	<0.0001	0.0065	0.0239	0.0001	0.0118	0.2277	0.2505	0.4426	0.0121

WBS: Warner-Bratzler blade force; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; L*: lightness-darkness; a*: redness; b*: yellowness; Meso: mesophilic bacteria; Lactic: lactic bacteria; Psy: psychotropic bacteria.

Table 2. Evaluation of pH, WBS force, and TBARS in *Semitendinosus* beef after ultrasound exposure during storage ($7 \pm 1^\circ\text{C}$)

	Days of storage					Mean	Tendency	
	0	3	5	9	16		L	Q
pH								
C	5.4 ^{bB}	5.7 ^{aB}	5.7 ^{abB}	5.6 ^{abB}	5.4 ^{bB}	5.6		**
B60	5.6 ^{bB}	6.2 ^{aAB}	6.3 ^{aAB}	5.3 ^{cC}	5.6 ^{bB}	5.8	**	**
B120	6.0 ^{bA}	6.5 ^{aA}	6.0 ^{bcB}	5.6 ^{cBC}	5.7 ^{cB}	6.0	*	
B240	6.0 ^{bA}	6.4 ^{aA}	6.4 ^{aAB}	5.7 ^{cAB}	5.7 ^{cAB}	6.0	**	**
P60	5.6 ^{cB}	5.9 ^{abB}	6.2 ^{aAB}	5.8 ^{bA}	5.7 ^{bcAB}	5.8		**
P120	6.1 ^{aA}	6.2 ^{aAB}	6.2 ^{aAB}	5.4 ^{bc}	5.6 ^{bB}	5.9	**	
P240	5.8 ^{bcAB}	6.3 ^{abA}	6.5 ^{aA}	5.7 ^{cAB}	5.9 ^{bAB}	6.1	**	**
Mean	5.8	6.2	6.2	5.6	5.7			
WBS force (N)								
C	56.2 ^{aA}	50.1 ^{aA}	45.3 ^{aAB}	55.5 ^{aA}	46.6 ^{aAB}	50.7		
B60	44.8 ^{bB}	51.0 ^{abA}	49.1 ^{abAB}	54.4 ^{aA}	52.1 ^{abA}	50.3	**	**
B120	40.3 ^{bB}	56.2 ^{aA}	54.4 ^{aA}	53.5 ^{aAB}	49.6 ^{aAB}	50.8	**	**
B240	47.8 ^{abB}	51.4 ^{abA}	51.4 ^{aAB}	41.9 ^{bB}	39.4 ^{bB}	46.4	**	
P60	56.5 ^{aA}	57.8 ^{aA}	46.0 ^{bAB}	42.4 ^{bB}	46.7 ^{bAB}	49.9	**	**
P120	45.6 ^{abB}	50.3 ^{aA}	51.8 ^{aAB}	45.1 ^{ab}	43.5 ^{aAB}	47.3	**	**
P240	45.2 ^{abB}	52.9 ^{aA}	42.7 ^{ab}	47.6 ^{aAB}	45.4 ^{aAB}	46.8		
Mean	48.1	52.8	48.7	48.6	46.2			
TBARS (malondialdehyde mg kg⁻¹)								
C	0.04 ^{bA}	0.04 ^{abB}	0.03 ^{bA}	0.03 ^{bAB}	0.10 ^{aA}	0.05	**	**
B60	0.03 ^{bA}	0.05 ^{abAB}	0.08 ^{aA}	0.02 ^{bB}	0.09 ^{aAB}	0.05	**	
B120	0.03 ^{aA}	0.08 ^{aAB}	0.03 ^{aA}	0.04 ^{aAB}	0.05 ^{aB}	0.05		
B240	0.02 ^{aA}	0.08 ^{aAB}	0.06 ^{aA}	0.04 ^{aAB}	0.05 ^{aB}	0.05		**
P60	0.03 ^{bA}	0.08 ^{abAB}	0.03 ^{bA}	0.03 ^{bB}	0.08 ^{aAB}	0.05	**	**
P120	0.04 ^{aA}	0.10 ^{aAB}	0.06 ^{aA}	0.04 ^{aAB}	0.07 ^{aB}	0.06		
P240	0.04 ^{bA}	0.14 ^{aA}	0.08 ^{abA}	0.05 ^{bA}	0.04 ^{bB}	0.07	**	**
Mean	0.03	0.08	0.05	0.03	0.07			

Least square means. Values with the same small letter in a row and the same capital letter in a column do not differ significantly at $P < 0.05$. C: control. untreated; B60: bath 60 s; B120: bath 120 s; B240: bath 240 s; P60: probe 60 s; P120: probe 120 s; P240: probe 240 s. Tendency: L: linear; Q: quadratic.

**Significant coefficient at $p < 0.05$.

Table 3. Evaluation of instrumental color parameters in *Semitendinosus* beef after ultrasound exposure during storage ($7 \pm 1^\circ\text{C}$)

	Days of storage					Mean	Tendency	
	0	3	5	9	16		L	Q
L*								
C	47.2 ^{bc}	56.0 ^{aAB}	54.5 ^{abB}	53.0 ^{abC}	57.1 ^{aB}	53.5	**	
B60	52.3 ^{bABC}	57.7 ^{abAB}	62.3 ^{aA}	54.4 ^{bC}	52.1 ^{bBC}	55.8		**
B120	57.8 ^{abAB}	64.8 ^{aA}	54.0 ^{bB}	53.9 ^{bC}	52.3 ^{bBC}	56.6	**	
B240	55.6 ^{aABC}	58.9 ^{aA}	56.8 ^{aAB}	57.6 ^{aBC}	59.4 ^{aB}	57.7		
P60	58.6 ^{aA}	49.9 ^{bB}	46.0 ^{bC}	50.0 ^{bC}	47.8 ^{bC}	50.5	**	**
P120	48.8 ^{bBC}	62.2 ^{aA}	63.0 ^{aA}	67.0 ^{aA}	49.2 ^{bC}	58.0		**
P240	54.1 ^{bcABC}	59.0 ^{bcA}	51.4 ^{bcB}	60.0 ^{bB}	69.0 ^{aA}	58.7	**	**
Mean	53.5	58.4	55.4	56.5	55.3			
a*								
C	26.4 ^{aAB}	25.1 ^{aAB}	29.0 ^{aA}	25.0 ^{aAB}	25.0 ^{aA}	26.1		
B60	21.7 ^{aB}	26.6 ^{aAB}	28.6 ^{aA}	26.2 ^{aA}	26.5 ^{aA}	25.9		**
B120	30.8 ^{aA}	30.8 ^{aA}	30.3 ^{aA}	26.2 ^{aA}	27.3 ^{aA}	29.1	**	
B240	24.0 ^{aB}	24.5 ^{aAB}	27.3 ^{aAB}	22.7 ^{aAB}	25.3 ^{aA}	24.8		
P60	22.2 ^{aB}	23.9 ^{aAB}	25.4 ^{aAB}	27.3 ^{aA}	25.3 ^{aA}	24.8		**
P120	24.9 ^{aAB}	21.7 ^{aB}	20.1 ^{aB}	18.8 ^{aB}	21.5 ^{aAB}	21.4		**
P240	22.2 ^{abB}	19.6 ^{abB}	23.6 ^{abAB}	25.5 ^{aAB}	15.8 ^{bB}	21.3	**	**
Mean	24.6	24.6	26.3	24.5	23.8			
b*								
C	10.4	10.2	13.2	11.5	11.6	11.4 ^A		
B60	6.3	10.0	13.0	11.7	11.0	10.4 ^A	**	**
B120	9.6	14.1	14.0	11.3	12.4	12.3 ^A		
B240	9.2	11.1	14.3	10.0	12.6	11.4 ^A		
P60	7.7	7.4	11.1	11.4	10.8	9.7 ^{AB}	**	
P120	8.6	5.0	7.3	8.1	9.0	7.6 ^B		
P240	7.1	10.3	10.4	10.8	9.4	9.6 ^{AB}		**
Mean	8.4 ^c	9.7 ^b	11.9 ^a	10.7 ^b	11.0 ^{ab}			

Least square means. Values with the same small letter in a row and capital letter in a column do not

differ significantly at $P < 0.05$. L*: lightness/darkness; a*: red/green; and b*: yellow/blue. C: control.

untreated; B60: bath 60 s; B120: bath 120 s; B240: bath 240 s; P60: probe 60 s; P120: probe 120 s;

P240: probe 240 s. Tendency: L: linear; Q: quadratic. **Significant coefficient at $p < 0.05$.

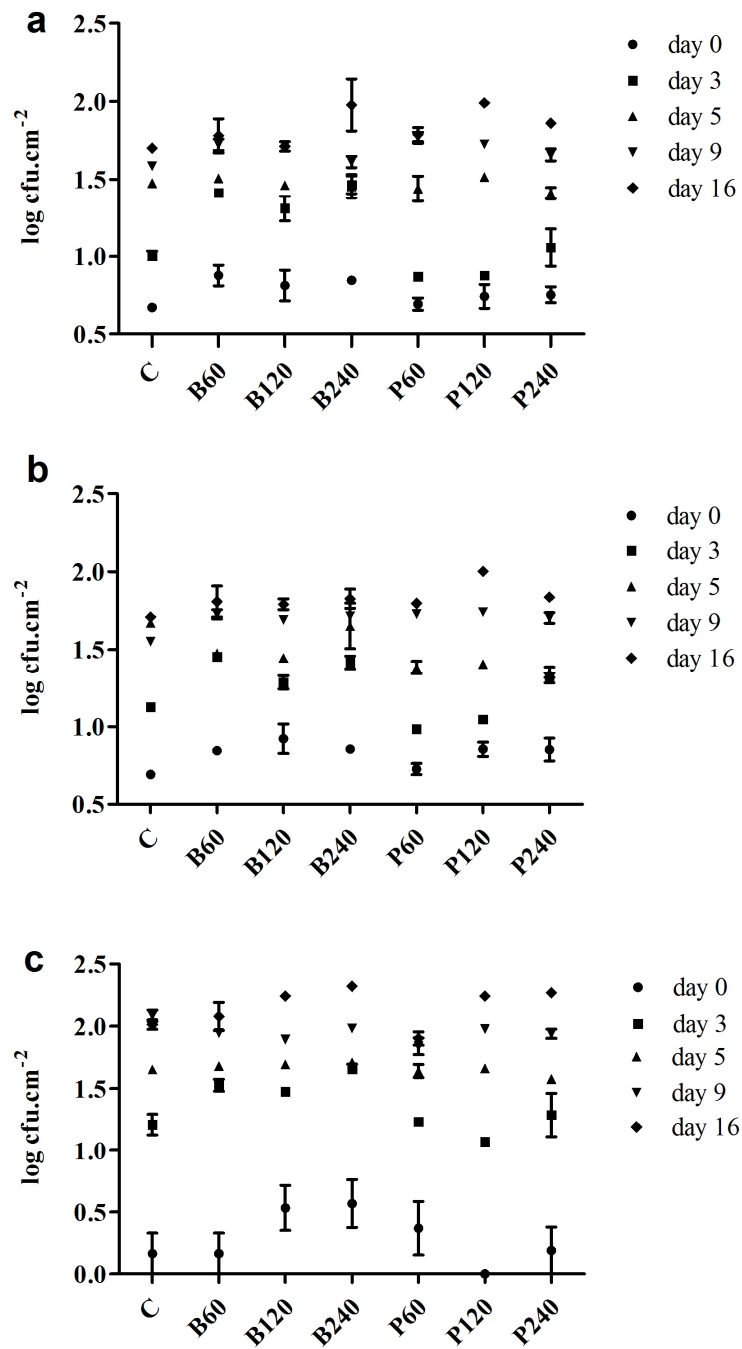


FIG. 1 EFFECT OF ULTRASONIC TREATMENT OF *SEMITENDINOSUS* BEEF ON MICROBIAL GROWTH DURING STORAGE ($7 \pm 1^\circ\text{C}$) OVER THE COURSE OF 16 DAYS. (A) MESOPHILIC MICROORGANISMS, (B) LACTIC ACID BACTERIA, AND (C) PSYCHOTROPIC MICROORGANISMS.

C: control. untreated; B60: bath 60 s; B120: bath 120 s; B240: bath 240 s; P60: probe 60 s; P120: probe 120 s; P240: probe 240 s. d0: day 0; d3: day 3; d5: day 5; d9: day 9; d16: day 16. Bars represent the standard error of the mean.

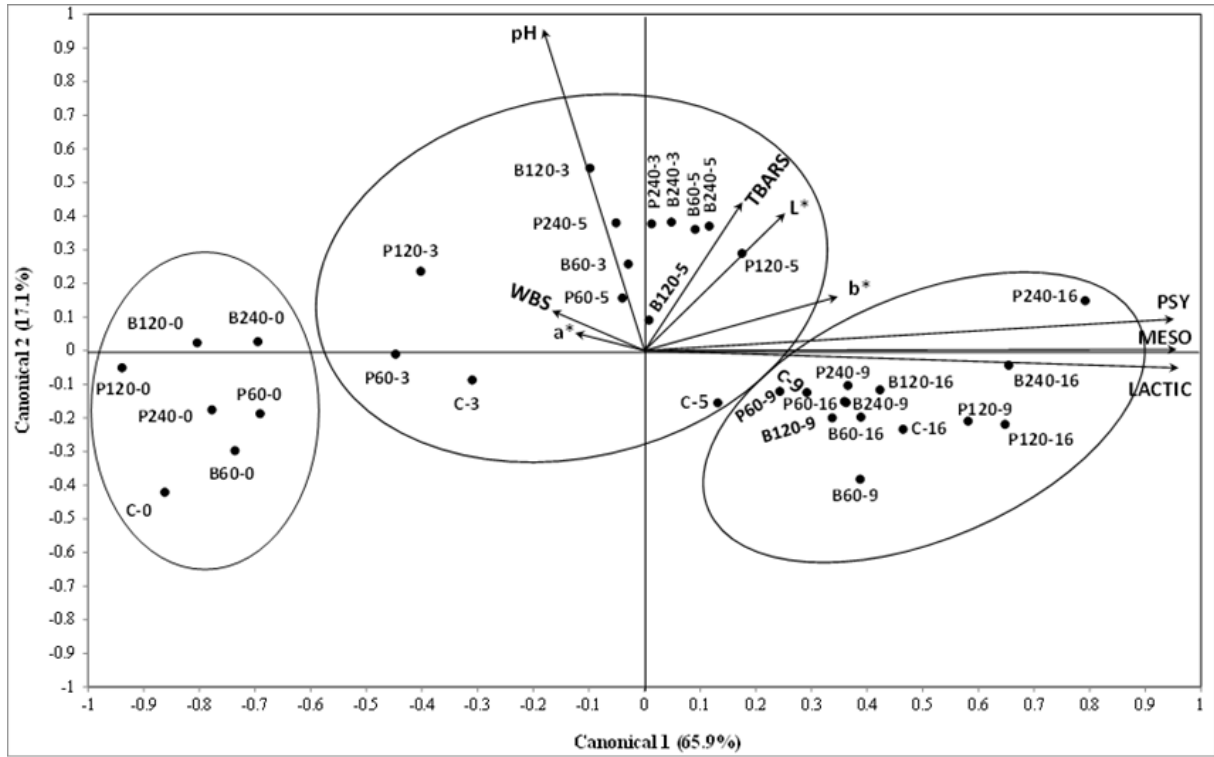
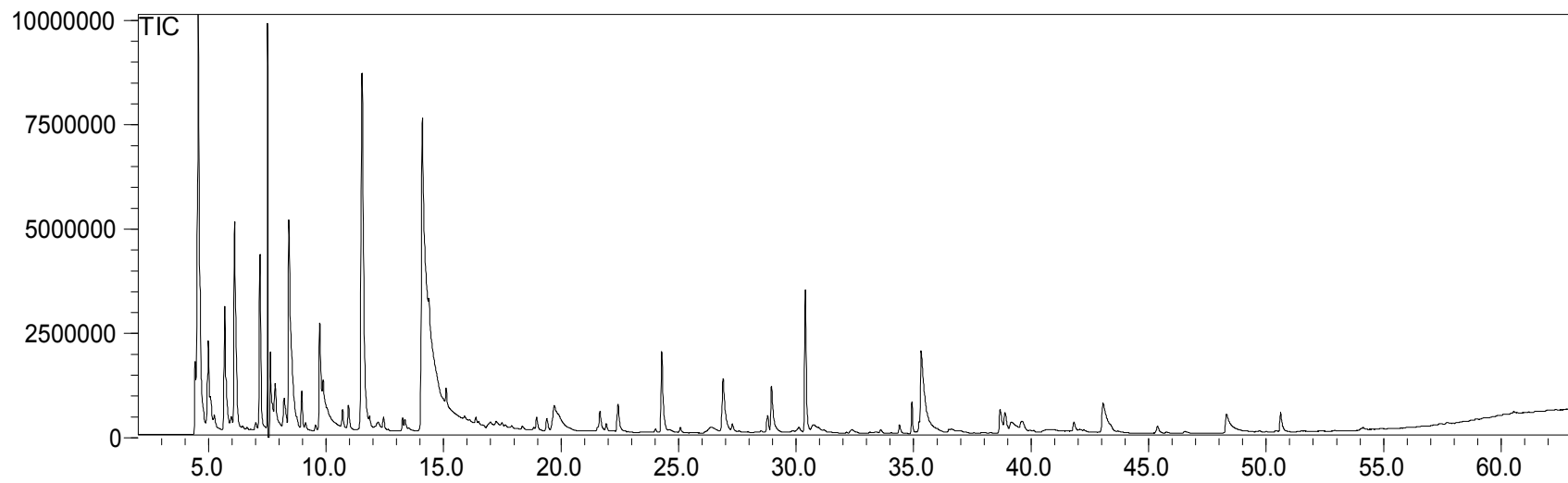


FIG. 2. DISCRIMINATION OF TREATMENTS ON THE BASIS OF CANONICAL DISCRIMINANT ANALYSIS.

C: control. untreated; B60: bath 60 s; B120: bath 120 s; B240: bath 240 s; P60: probe 60 s; P120: probe 120 s; P240: probe 240 s.; after treatment/trace: 0: day 0; 3: day 3; 5: day 5; 9: day 9; 16: day 16.

APÊNDICE D

EXEMPLO DE CROMATOGRAMA OBTIDO NA ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS



ANEXO A

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO FOOD BIOPROCESS TECHNOLOGY

Food Science & Nutrition [Home](#) > [Food Science & Nutrition](#)[JOURNALS](#) [BOOKS](#) [SERIES](#)

Food and Bioprocess Technology

An International Journal

Editor-in-Chief: Da-Wen Sun

ISSN: 1935-5130 (print version)

ISSN: 1935-5149 (electronic version)

Journal no. 11947

[RECOMMEND TO LIBRARIAN](#)[ABOUT THIS JOURNAL](#) [EDITORIAL BOARD](#) [NEWS](#) [ETHICS & DISCLOSURES](#) [INSTRUCTIONS FOR AUTHORS](#)

Instructions for Authors

GENERAL INFORMATION

Authors MUST submit their articles to Food and Bioprocess Technology online at <http://editorialmanager.com/fabt>. Manuscripts for FABT must have a strong food focus and contain elements of engineering/technology. In principle, manuscripts, which are on food science, food chemistry, food microbiology, food nutrition or food biotechnology, and without any engineering/technology component, will not be considered. In addition, MANUSCRIPTS FOR FABT MUST CONTAIN SUFFICIENT NOVELTIES.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit online" on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TYPES OF PAPERS

Original Paper, Review, Editorial, Communication

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ⌘ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- ⌘ Use italics for emphasis.
- ⌘ Use the automatic page numbering function to number the pages.
- ⌘ Do not use field functions.
- ⌘ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- ⌘ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ⌘ Use the equation editor or MathType for equations.
- ⌘ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SPECIAL INSTRUCTION ON TEXT

TEXT, arranged in the order:

- 1) INTRODUCTION-clearly state the purpose of the article. Summarize the rationale for the study or observation. Give only strictly pertinent references, and do not review the subject extensively. Each manuscript must contain an INTRODUCTION section,
- 2) MATERIALS AND METHODS-describe your selection of the observational or experimental subjects clearly. Identify the methods, apparatus (manufacturer's name and address in parenthesis), and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods; provide references and brief descriptions of methods that have been published but are not well-known, describe substantially modified methods, including statistical methods, give reasons for using them, and evaluate their limitations,
- 3) RESULTS AND DISCUSSION - present your results in a logical sequence in the text, tables, and figures. Do not repeat in the text all the data in the tables and/or illustrations; emphasize or summarize only important observations. Indicate clearly number of replicates used and statistical analysis employed in experiments. Discuss the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies,
- 4) CONCLUSIONS - summarize the new findings of the study. Do not repeat in detail data given in the Results and Discussion section. Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by your data. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such. Recommendations, when appropriate, may be included. Each Manuscript must contain a CONCLUSION section, and
- 5) ACKNOWLEDGMENTS-acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

REFERENCES

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

⌘ Journal article

Harris, M., Karper, E., Stacks, G., Hoffman, D., DeNiro, R., Cruz, P., et al. (2001). Writing labs and the Hollywood connection. *Journal of Film Writing*, 44(3), 213–245.

⌘ Article by DOI

Slifka, M. K., & Whitton, J. L. (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Journal of Molecular Medicine*, doi:10.1007/s001090000086

⌘ Book

Calfee, R. C., & Valencia, R. R. (1991). *APA guide to preparing manuscripts for journal publication*. Washington, DC: American Psychological Association.

⌘ Book chapter

O'Neil, J. M., & Egan, J. (1992). Men's and women's gender role journeys: Metaphor for healing, transition, and transformation. In B. R. Wainrib (Ed.), *Gender issues across the life cycle* (pp. 107–123). New York: Springer.

⌘ Online document

Abou-Allaban, Y., Dell, M. L., Greenberg, W., Lomax, J., Peteet, J., Torres, M., & Cowell, V. (2006). Religious/spiritual commitments and psychiatric practice. Resource document. American Psychiatric Association. http://www.psych.org/edu/other_res/lib_archives/archives/200604.pdf. Accessed 25 June 2007.

Journal names and book titles should be italicized.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

TABLES

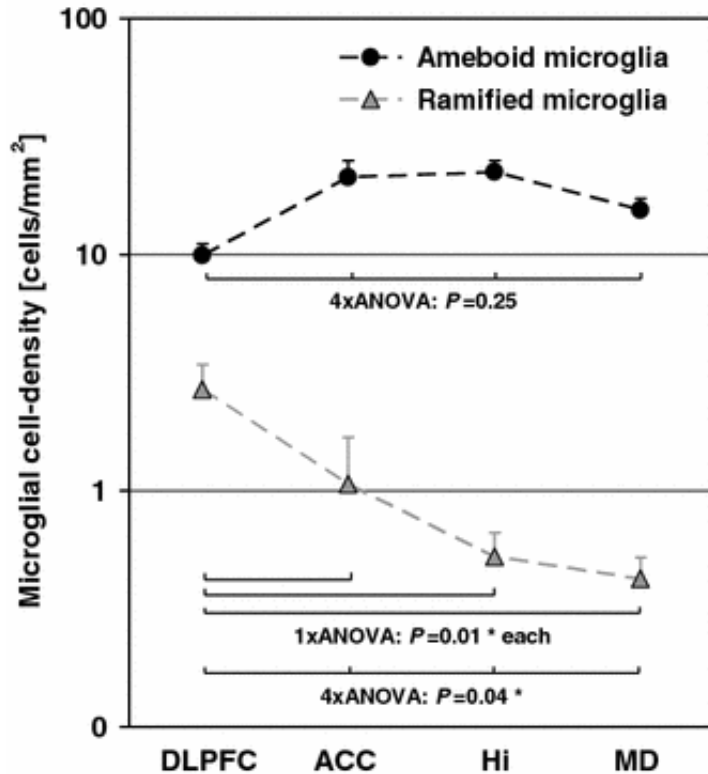
- ⌘ All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- ⌘ Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- ⌘ For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- ⌘ Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- ⌘ Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- ⌘ Supply all figures electronically.
- ⌘ Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- ⌘ For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- ⌘ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- ⌘ Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



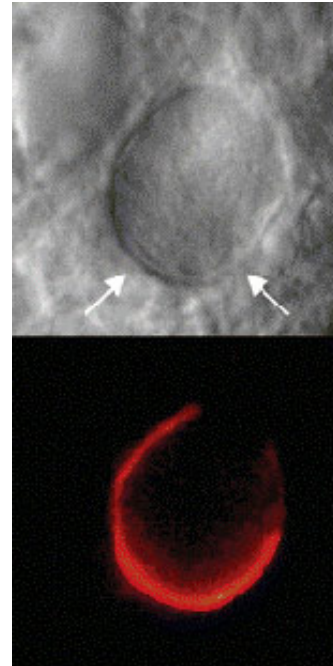
- ⌘ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ⌘ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ⌘ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ⌘ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ⌘ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

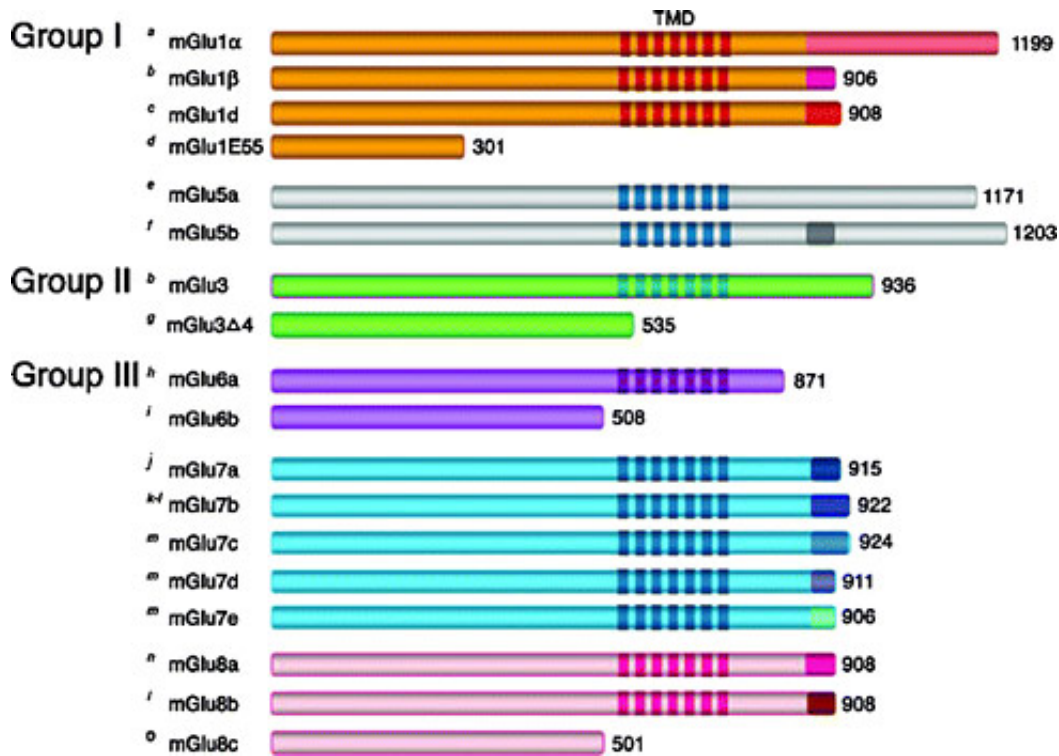
Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.



Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- ⌘ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- ⌘ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- ⌘ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- ⌘ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- ⌘ Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ⌘ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ⌘ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ⌘ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ⌘ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ⌘ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the

animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- ⌘ The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- ⌘ The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling ("self-plagiarism")).
- ⌘ A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salami-publishing").
- ⌘ No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- ⌘ No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- ⌘ Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- ⌘ Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.

Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.

The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest
Research involving Human Participants and/or Animals
Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- ⌘ Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- ⌘ Honoraria for speaking at symposia
- ⌘ Financial support for attending symposia
- ⌘ Financial support for educational programs
- ⌘ Employment or consultation
- ⌘ Support from a project sponsor
- ⌘ Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- ⌘ Multiple affiliations
- ⌘ Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- ⌘ Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- ⌘ Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found

here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application

at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

OPEN CHOICE

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Open Choice

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

SCIENTIFIC STYLE

- ⌘ Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).
- ⌘ Nomenclature: Insofar as possible, authors should use systematic names similar to those used by Chemical Abstract Service or IUPAC.
- ⌘ Genus and species names should be in italics.
- ⌘ Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.
- ⌘ Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols, etc.:

Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities

Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)

Bold for vectors, tensors, and matrices.

LANGUAGE

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

Edanz Editing Global

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

READ THIS JOURNAL ON SPRINGERLINK

[View Open Access Articles](#)

[Online First Articles](#)

[All volumes & issues](#)

FOR AUTHORS AND EDITORS

2014 Impact Factor

2.691[Aims and Scope](#)[Submit Online](#)[Open Choice - Your Way to Open Access](#)[Author Academy: Training for Authors](#)[Instructions for Authors](#)

SERVICES FOR THE JOURNAL

[Contacts](#)[Download Product Flyer](#)[Shipping dates](#)

ALERTS FOR THIS JOURNAL

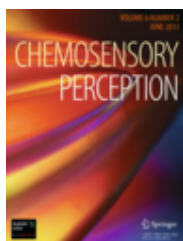
Get the table of contents of every new issue published in [Food and Bioprocess Technology](#).

Your E-Mail Address

SUBMIT

Please send me information on new Springer publications in [Food Science](#).

RELATED BOOKS - SERIES - JOURNALS



Journal

**Chemosensory
Perception****Editor»** Editor-in-Chief:
Jeannine **Delwiche**[BACK](#)[NEXT](#)

1/10

ANEXO B

**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO FOOD RESEARCH
INTERNATIONAL**



FOOD RESEARCH INTERNATIONAL

A journal of the [Canadian Institute of Food Science and Technology \(CIFST\)](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Impact Factor	p.2
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.5



ISSN: 0963-9969

DESCRIPTION

Food Research International provides a forum for the rapid dissemination of significant novel and high impact research in food science, technology, engineering and nutrition. The journal only publishes novel, high quality and high impact review papers, original research papers, short communications and letters to the editors, in the various disciplines encompassing the science and technology of food. It is journal policy to publish special issues on topical and emergent subjects of food research or food research-related areas. Special issues of selected, peer-reviewed papers from scientific meetings, workshops, conferences on the science, technology and engineering of foods will be also published.

Food Research International is the successor to the Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. Building on the quality and strengths of its predecessor, *Food Research International* has been developed to create a truly international forum for the communication of research in **food science**.

Topics covered by the journal include:

food chemistry food microbiology and safety food toxicology materials science of foods food engineering physical properties of foods sensory science food quality health and nutrition food biophysics analysis of foods food nanotechnology emerging technologies environmental and sustainability aspects of food processing.

Subjects that **will not** be considered for publication in *Food Research International*, and will be rejected as being outside of scope, include :

Studies testing different formulations and ingredients leading to the choice of the best formulation or ingredient to be used in the manufacture of a specified food; Optimization studies aiming to determine processing conditions and/or raw materials that increase the yield of a production process or improve nutritional and sensorial qualities; Studies describing the production of ingredients and only their characterization without a strong mechanistic emphasis; Studies describing the antioxidant potential of foods lacking identification of the compounds responsible for the antioxidant activity will not be published. This is also valid for any other chemical compounds such as phytochemicals and minor components of foods; Studies on antimicrobial compounds that do not consider a validation step in foods, lacking full data on chemical composition indicating the compounds responsible for the inhibitory activity and, when appropriate, the use of molecular biology approaches to support the findings; Development of analytical methods not comprising a validation step in situ that represent the range of conditions faced during their application will not be considered; Surveys of chemical, nutritional, physical and microbiological hazards will not be considered. Only papers presenting a significant data set, wide coverage, novel and supported by adequate chemical or microbiological techniques will be considered; Pharmacology and nutritional studies papers focusing in hosts rather

than in foods or effects of processing in major and minor components of foods. Pharmacology and nutritional studies that do not contain bioavailability or biofunctionality. Engineering studies lacking of mathematical verification or validation in situ, when appropriate; Fragmented studies, of low scientific quality, or poorly written. Studies with no food component.

IMPACT FACTOR

2014: 2.818 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA
BIOSIS
Elsevier BIOBASE
Chemical Abstracts
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Current Packaging Abstracts
Index to Scientific Reviews
International Packaging Abstracts
FSTA (Food Science and Technology Abstracts)
Publications in Food Microbiology
Science Citation Index
CAB Abstracts
Scopus
EMBiology

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

A. Sant'Ana, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

Associate Editors

Sensory Aspects of Foods

G. Ares, Universidad de la República, Pando, Canelones, Uruguay

Emerging Technologies

F.J. Barba, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark

Food Toxicology

B. De Meulenaer, Ghent University, Ghent, Belgium

Food Chemistry and Analysis

V. Gökmen, Hacettepe University, Ankara, Turkey

Food Omics

P. Ferranti, University of Naples Federico II, Naples, Italy

Nutrigenomics

A. Mackie, Institute of Food Research, Norwich, UK

Food Engineering and Materials Science of Foods

F. Maleky, Ohio State University, Columbus, Ohio, USA

Functional Foods

A. Schieber, University of Bonn, Bonn, Germany

Food Microbiology, Safety and Quality

P. Skandamis, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

Editorial Board Members

H.G. Akilloğlu, Hacettepe University, Ankara, Turkey

A. Altunkaya, Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Ankara, Turkey
A. Álvarez-Ordóñez, Teagasc, Cork, Ireland
P. Andrade, Universidade do Porto, Porto, Portugal
C. Apetrei, Dunarea de Jos University of Galati, Galati, Romania
M. Arlorio, Università degli Studi del Piemonte Orientale, Novara, Italy
H. Bi, Chinese Academy of Sciences (CAS), Qinghai, China
L. Cai, MGP Ingredients, Inc., Atchison, Kansas, USA
R. Carle, Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany
B. Chen, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, USA
R.C. Chisté, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Pará, Brazil
D. Cozzolino, CQUniversity Australia, North Rockhampton, Queensland, Australia
V. de Freitas, Universidade do Porto, Porto, Portugal
A. Del Caro, University of Sassari, Sassari, Italy
M.A. Del Nobile, University of Foggia, Foggia, Italy
R. Deliza, EMBRAPA Brazil, Rio de Janeiro, Brazil
H.M.W. den Besten, Wageningen Universiteit, Wageningen, Netherlands
D.R. Dias, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brazil
F. Ding, Qingdao Agricultural University, Qingdao, China
O. Duman, Akdeniz University, Antalya, Turkey
I.C.F.R Ferreira, Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Bragança, Portugal
A. Fiorentino, Seconda Università degli Studi di Napoli, Caserta, Italy
S. Fiszman, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Paterna Valencia, Spain
C.M. Galanakis, Galanakis Laboratories, Chania, Greece
M. Gänzle, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
C. Gebara, University of São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil
M. Giordano, University of Turin, Grugliasco (TO), Italy
A. Giri, European Commission Joint Research Centre (JRC), Geel, Belgium
A. Gomes da Cruz, Federal Institute of Education, Science and Technology, Rio de Janeiro, Brazil
S. Gorinstein, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel
D. Granato, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil
L. He, University of Massachusetts, Amherst, Massachusetts, USA
L. Iacumin, Università degli studi di Udine, Udine, Italy
E. Janiszewska-Turak, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Warsaw, Poland
M.E. Jaramillo-Flores, National School of Biological Sciences-IPN, D. F. Mexico
Y. Jiang, Chinese Academy of Sciences (CAS), China
P. Kandyliis, University of Patras, Patras, Greece
V. Kontogiorgos, University of Huddersfield, Queensgate, England, UK
M. Labra, Università degli Studi di Milano-Bicocca, Milan, Italy
H.S. Lee, EWHA Womans University, Seoul, South Korea
Y. Luo, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA
C.-Y. Ma, The University of Hong Kong, Hong Kong, China
A.R.M.F.M. Madureira, Universidade Católica Portuguesa, Porto, Portugal
A.G. Marangoni, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada
M. Marcone, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada
J.-C. Marques, Universidade da Madeira, Funchal, Madeira, Portugal
S. Martini, Utah State University, Logan, Utah, USA
J. McCallum, Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC), Charlottetown, Pr. Edward Island, Canada
L. Melo, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
D. Mercer, University of Guelph, Kemptville, Ontario, Canada
M. Mesias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain
V. Muchenje, University of Fort Hare, Alice, RSA
M. Netzel, University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia
M.A. Neves, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki, Japan
M. Nickerson, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada
S.F. O'Keefe, Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, Virginia, USA
K.L. Parkin, University of Wisconsin at Madison, Madison, Wisconsin, USA
A.T. Paulson, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada
M.T. Pedrosa Silva Clerici, University of Campinas, Brazil
J. Pérez-Jiménez, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain
F. Perez-Rodriguez, Universidad de Cordoba, Córdoba, Spain
V.I. Petropulos, University Goce Delcev, Stip, Macedonia
S. Rohn, Universität Hamburg, Hamburg, Germany
M.F. Sa Barroso, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Porto, Madeira, Portugal
R. Siciliano, National Research Council of Italy (CNR), Avellino, Italy
H. Singh, Massey University, Palmerston North, New Zealand
N. Singh, Guru Nanak Dev University, Amritsar, India
U. Sonesson, SIK, The Swedish Institute for Food & Biotechnology, Göteborg, Sweden

W. Sun, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong, China
C.-H. Tang, South China University of Technology, Guangzhou, China
I. Techakriengkrai, Ramkhamhaeng University, Huamark Bangkok, Thailand
R.V. Tikekar, University of Maryland, College Park, Maryland, USA
L. Truelstrup Hansen, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada
V.P. Valdramidis, University of Malta, Msida, Malta
D. Valentin, Université de Bourgogne, Dijon, France
F.R. van de Voort, McGill University, Ste Anne de Bellevue, Quebec, Canada
P. Varela, Nofima, Ås, Norway
M. Viuda Martos, Universidad Miguel Hernández, Orihuela, Alicante, Spain
R.Y. Yada, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada
C.-T. Yeh, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan
R. Yettella V Ramesh, AAK USA, Edison, New Jersey, USA
L. Yu, CSIRO (The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization), Clayton, Victoria, Australia
W.-C. Zeng, Sichuan University, Sichuan, China
H. Zhao, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong, China

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Food Research International is the successor to the Canadian Institute of Food Science and Technology Journal. Building on the quality and strengths of its predecessor, *Food Research International* has been developed to create a truly international forum for the communication of research in food science.

Food Research International provides a forum for the rapid dissemination of significant novel and high impact research in food science, technology, engineering and nutrition. The journal only publishes novel, high quality and high impact review papers, original research papers, short communications and letters to the editors, in the various disciplines encompassing the science and technology of food. It is journal policy to publish special issues on topical and emergent subjects of food research or food research-related areas. Special issues of selected, peer-reviewed papers from scientific meetings, workshops, conferences on the science, technology and engineering of foods will be also published.

Food Research International does not publish papers with a product development emphasis, statistical optimizations of processes or surveys. This is based on the editorial policy of the journal to publish more fundamental work with a strong quantitative emphasis and of a general nature.

Topics covered by the journal include:

food chemistry food microbiology and safety food toxicology materials science of foods food engineering physical properties of foods sensory science food quality health and nutrition food biophysics analysis of foods food nanotechnology emerging technologies environmental and sustainability aspects of food processing.

Please also refer to the list of subjects not considered in *Food Research International* before you submit your paper. These topics can be found in [the full aims and scope of the journal](#).

Types of paper

Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 6,000 words (including allowance for tables and illustrations). Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 12,000 words (including allowance for tables and illustrations). Short communications - Authors may submit short communications of significant preliminary findings of about 3000 words and 3 figures/tables on any subject covered by the Aims and Scope. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest. Book Reviews

Food Research International is concerned with safeguarding the rights and welfare of animals and human research subjects. Authors must provide a letter with the approval from the ethics committee from the respective University or research center where the study was performed.

Contact details for submission

Submission for all types of manuscripts to *Food Research International* proceeds totally online. Via the Elsevier Editorial System (EES) website for this journal, <http://ees.elsevier.com/foodres>, you will be guided step-by-step through the creation and uploading of the various files.

Questions regarding content of a proposed submission can be directed to: foodresearchinternational@gmail.com.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements

for manuscripts submitted to Biomedical journals, <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. **All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines.** More information can be found at <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf (e.g. by their research funder or institution).

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3550**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver

value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

All pages of the manuscript must be numbered. All lines must be numbered continuously throughout the manuscript.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Authors are encouraged to read the helpful notes on statistics applied in the planning of experiments and assessment of results in the field of food science and technology. The more important univariate and bivariate parametric and non-parametric methods, their advantages and disadvantages are presented in "Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology by Granato (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913005723>).

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <https://www.elsevier.com/PubChem>.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-research-international>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the

link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found at <http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>. Please use the following template to write your Data in Brief: <https://www.elsevier.com/dib-template>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>