



 Ana Karolina Cherobin¹
 Adrieli Maiandra Piccinin do Amaral¹
 Liziane Schittler Moroni¹
 Darlene Cavalheiro¹
 Georgía Ane Raquel Sehn¹

¹ Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química. Pinhalzinho, SC, Brasil.

Correspondência
Georgía Ane Raquel Sehn
georgia.sehn@udesc.br

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC - 2023TR565)

Extrato de espinafre como fonte de nitrito em linguiça frescal: atributos de qualidade e estabilidade durante o armazenamento refrigerado

Spinach Extract as a source of nitrite in fresh sausages: quality attributes and stability during refrigerated storage

Resumo

Introdução: Os consumidores têm inúmeras preocupações em relação à saúde, dentre as quais o consumo elevado de aditivos químicos, como os conservantes, que ao reagir com substâncias presentes nos alimentos podem produzir compostos cancerígenos. Alguns vegetais, como o espinafre, podem ser fontes naturais desses conservantes, e sua aplicação pode aumentar a saudabilidade dos produtos cárneos. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do extrato de espinafre como fonte de nitrito para conservação de linguiças frescas, armazenadas durante 35 dias sob refrigeração. **Material e Método:** Quatro formulações foram produzidas: controle positivo, com sal de cura comercial (CP), controle negativo, sem sal de cura (CN), extrato de espinafre (EE) e extrato de espinafre pré-convertido por bactérias nitrato-redutoras (EEPC). As linguiças foram avaliadas através da composição centesimal, cor, teor residual de nitrito, TBARS e avaliação microbiológica. **Resultados:** O sal de cura (CP) resultou em menores alterações na coloração das linguiças frescas. O TBARS aumentou aproximadamente 2,5 vezes ($p < 0,05$) ao longo dos 35 dias, em todas as formulações, e os menores valores, ao final desse período, foram encontrados nas formulações CP e EEPC. Estas mesmas formulações apresentaram os maiores teores residuais de nitrito e menor contagem de BAL e enterobactérias (35 dias), o que comprova que o EEPC é tão eficiente quanto o sal de cura comercial como conservante em linguiça frescal armazenada sob refrigeração. **Conclusão:** O uso de EEPC pode ser uma alternativa promissora para a indústria cárnea, possibilitando o desenvolvimento de produtos *clean label* que atendam à demanda por produtos mais saudáveis.

Palavras-chave: Nitrato. Produtos da carne. Alimento saudável. Vegetais.

Abstract

Introduction: Consumers express concerns about chemical additives in the diet, including preservatives, which can produce carcinogenic compounds when interacting with substances present in food. Some vegetables, such as spinach, can be natural sources of preservatives, and their application can increase the healthiness of meat products. **Objective:** To evaluate the effects of spinach extract as a source of nitrite for the preservation of fresh sausages during 35 days of refrigerated storage. **Material and Method:** Four formulations were produced: positive control, with commercial curing salt (CP), negative control, without curing salt (CN), spinach extract (EE) and spinach extract pre-converted by nitrate-reducing bacteria (EEPC). The sausages were evaluated for proximate composition, color parameters, residual nitrite content, TBARS, and microbiological characterization. **Results:** The curing salt

(CP) led to a few changes in the color of the fresh sausages. TBARS increased approximately 2.5 times ($p < 0.05$) during the 35 days for all formulations, and the lowest values were found for the formulations CP and EEPC at the end of the storage. These formulations had the highest residual nitrite levels and the lowest LAB and enterobacteria count (35 days), which proves that EEPC is an effective preservative to replace commercial curing salt in fresh sausages subjected to refrigerated storage.

Conclusion: The use of EEPC can be a promising alternative for the meat industry, enabling the development of clean-label products that meet the demand for healthier products.

Keywords: Nitrate. Meat products. Healthy food. Vegetables.

INTRODUÇÃO

Os sais de cura à base de nitrito e nitrato são utilizados em produtos cárneos curados, a fim de auxiliar no desenvolvimento da cor e do sabor, controlar a oxidação lipídica, retardando o desenvolvimento da rancificação, e inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos, como o *Clostridium botulinum*. Esses aditivos químicos são frequentemente utilizados em associação, devido ao nitrato ser mais benéfico nos processos de cura no longo prazo, enquanto os nitritos geralmente atuam no início do processo.¹

Pesquisas apontam que os nitritos e nitratos contidos nos produtos cárneos podem reagir com certas aminas presentes nos alimentos e produzir compostos N-nitrosos, como as nitrosaminas, que são cancerígenos responsáveis por desencadear um aumento no risco de câncer gástrico, principal enfermidade associada ao consumo de carnes processadas.²⁻⁴

Em geral, os consumidores têm inúmeras preocupações em relação a saúde e segurança dos alimentos, dentre as quais o consumo de produtos com grande quantidade de aditivos químicos nas formulações, como os conservantes, o que aumenta a demanda por alimentos com ingredientes naturais em sua composição. Alguns vegetais podem ser fontes naturais de nitrito e nitrato, como beterraba, semente de uva, castanhas, polpa de tomate orgânico, alho-poró, espinafre, entre outros. Estes possuem, em sua composição, consideráveis quantidades de nitrato, que podem ser utilizadas como fonte alternativa deste aditivo em produtos à base de carne.⁵⁻⁸

O espinafre (*Spinacia oleracea*), além de ser conhecido pelo seu alto teor de ferro, possui em sua formulação elevadas quantidades de nitrato e nitrito, sendo que os níveis de nitrato são considerados significativamente altos neste folhoso.⁹⁻¹¹ Sebranek & Bacus¹² relataram níveis de 3.227 ppm de nitrato no suco de espinafre. Além disso, o fácil plantio e o rápido crescimento em qualquer estação do ano tornam o espinafre uma matéria-prima rentável para aplicação na indústria alimentícia.¹³

Considerando a necessidade de as indústrias alimentícias reduzirem e/ou substituírem o uso de aditivos químicos na produção de alimentos, a fim de produzir alimentos mais saudáveis, e também o elevado conteúdo de nitrato no espinafre, que pode servir como um conservante natural para esse tipo de indústria, o objetivo deste estudo foi avaliar as características físico-químicas e microbiológicas de linguiças frescas suínas com adição de extratos de espinafre e de espinafre pré-convertido por bactérias nitrato-redutoras como fonte alternativa de nitrito durante o armazenamento sob refrigeração.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Os reagentes utilizados para a realização das análises e elaboração das linguiças foram: hidróxido de sódio, tetraborato de sódio, acetato de zinco, fosfato de sódio dibásico e ferrocianeto de potássio da Synth (São Paulo, Brasil). Sulfanilamida e N-(1-Naftil) etilenodiamina (NED) da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Ágar *plate count* (PCA), ágar MRS e ágar VRBG da Merck (Belo Horizonte, Brasil). O sal de cura utilizado foi o Kura Tel Frescal da Conatril - SBR Foods Ltda (Rio Claro, Brasil). Os demais reagentes eram de grau analítico. Os espinafres foram coletados na cidade de Chapecó-SC, Brasil (latitude: 27° 05' 47" S, longitude: 52° 37' 06" W). As matérias-primas utilizadas para a produção das linguiças frescas foram adquiridas em mercado local da cidade de Pinhalzinho-SC.

Obtenção do pó do espinafre

Os espinafres foram higienizados com solução de hipoclorito de sódio 200 ppm por 15 min e, após, enxaguados em água corrente. Os espinafres (talo e folha) foram submetidos ao processo de secagem a 80 °C (temperatura baseada em pré-testes) em estufa com sistema de convecção forçada de ar CE-205 (Cienlab, Brasil) até atingir níveis inferiores a 10% de umidade (aproximadamente 6 h). Após, foram triturados em liquidificador (Diamante 800, Britânia, Brasil) e peneirados em peneira de Tyler de 32 mesh (Bertel, Brasil).

Preparo e caracterização dos extratos do espinafre

Para o preparo dos extratos, 20 g do pó de espinafre foram misturados com 200 mL de água destilada e mantidos por 2 horas a 90°C em banho termostático SSD 5L (Solidsteel, Brasil) para extração dos compostos de interesse, seguindo metodologia proposta por Gardes et al.,¹⁴ com adaptações. Em seguida, o extrato foi dividido em duas partes, extrato 1 (extrato de espinafre pré-convertido - EEPC) e extrato 2 (extrato de espinafre - EE). Ao EEPC foi adicionado 0,05% (m:v) de cultura de nitrato redutase ativa contendo *Staphylococcus carnosus* *Staphylococcus xylosus* (Bactoferm SM-75, CHR Hansen) e a mistura foi mantida em uma incubadora *shaker* Luca-223 (Lucadema, Brasil) a 30 °C por 24 horas, com agitação de 100 rpm. Após, a solução foi centrifugada em centrífuga SL-700 (Solab, Brasil) a 6.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado com papel filtro Whatman nº 1 e mantido em estufa de secagem modelo 80/280 (Lucadema, Brasil) a 90 °C por 15 horas para concentração do extrato e inativação da cultura. O EE foi centrifugado por 10 minutos a 6.000 rpm e o sobrenadante filtrado com papel filtro Whatman nº 1 e mantido em estufa de secagem 80/280 (Lucadema, Brasil) a 90 °C por 15 horas, para concentração do extrato. Os extratos EEPC e EE foram armazenados em frascos âmbar, a 4 °C e avaliados, em triplicata, através das análises descritas a seguir.

Determinação de pH, conforme método 981.12.¹⁵ Teor residual de nitrito através do método espectrofotométrico descrito por Oliveira et al.,¹⁶ em que 10 g de amostra foram quantificadas em um Erlenmeyer e adicionadas de 100 mL de água deionizada a 60 °C. Em seguida foram acrescentados 5 mL da solução de tetraborato de sódio a 0,5% (m:v) e mantida por 15 minutos sob agitação em banho termostático LUCA-157/28 (Lucadema, Brasil). Após, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e foram adicionados 5 mL de solução de ferrocianeto de potássio 15% (m:v) e 5 mL de solução de acetato de zinco 30% (m:v), e o volume foi completado com água deionizada. A solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1, e 10 mL destes foram transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, onde foram adicionados 5 mL da solução de sulfanilamida 0,5% (m:v) e esta permaneceu em repouso por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mL de solução NED 0,5% (m:v), e o volume foi completado com água deionizada. A solução remanescente foi mantida em repouso por 30 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro Cirrus 80SA (Femto, BRA) em um comprimento de onda de 540 nm. A curva padrão foi previamente preparada com concentrações de 0,16 a 1,12 mg.kg⁻¹ de nitrito de sódio seguindo o mesmo tratamento dado as amostras. Os resultados foram expressos em mg.kg⁻¹ de amostra.

Teor residual de nitrato, através do método proposto por Cataldo et al.,¹⁷ com adaptações. Transferiu-se 0,2 mL dos extratos para um Becker contendo 0,8 mL de solução de ácido salicílico 5% (v/v) em ácido sulfúrico PA e esta foi mantida durante 20 minutos em temperatura ambiente para ocorrência da reação. Em seguida, foram adicionados 19 mL de hidróxido de sódio 2 N e após a estabilização da temperatura (25 °C), para o desenvolvimento da cor, foram efetuadas as leituras em espectrofotômetro Cirrus 80SA (Femto, Brasil) no comprimento de onda de 410 nm. A curva padrão foi preparada com concentrações de 0,002 a

0,06 mg.mL⁻¹ de nitrato de sódio seguindo o mesmo tratamento das amostras. Os resultados foram expressos em mg.kg⁻¹ de amostra.

Produção das linguiças frescas com extrato do espinafre

As linguiças frescas foram elaboradas conforme formulações descritas na Tabela 1, sendo elas: controle negativo (CN), contendo apenas matéria-prima cárnea; controle positivo (CP), contendo sal de cura com nitrato/nitrito; EEPC, contendo 4% do extrato EEPC (pré-convertido por bactérias nitrato-redutoras); e EE, contendo 4% de extrato EE. As linguiças foram produzidas a partir da carne e gordura suína previamente trituradas em disco de 8 mm em moedor industrial MSI-10 (Becker, Brasil), adicionadas dos demais ingredientes e misturadas de forma manual por 15 minutos; em seguida foram embutidas em tripa natural suína com calibre de 36 mm. A formulação controle possui menor conteúdo de sal, devido ao condimento de nitrito/nitrato de sódio adicionado conter sal em sua formulação.

Tabela 1. Formulações das linguiças frescas suínas produzidas com diferentes tipos de conservantes. Pinhalzinho, SC, 2022.

Matérias-primas e ingredientes	CN (%)	CP (%)	EEPC (%)	EE (%)
Pernil suíno	85	85	85	85
Toucinho	15	15	15	15
Sal	2	1,575	2	2
Eritorbato de sódio	0,1	0,1	0,1	0,1
Açúcar	0,1	0,1	0,1	0,1
Alho em pó	0,05	0,05	0,05	0,05
Cebola em pó	0,05	0,05	0,05	0,05
Pimenta preta em pó	0,025	0,025	0,025	0,025
Água	4	4	-	-
Extrato de espinafre (E1)	-	-	4	-
Extrato de espinafre (E2)	-	-	-	4
Sal de cura	-	0,425	-	-

Linguiças frescas suínas produzidas com diferentes conservantes: CN-Control negativo, sem sal de cura; CP - controle positivo com sal de cura; EE - extrato de espinafre; EEPC - extrato de espinafre pré-convertido.

As linguiças foram embaladas a vácuo em seladora 200 S (Selovac, Brasil) e armazenadas sob refrigeração a 4 °C (Solid Steel, Brasil). Todos os tratamentos foram replicados três vezes. Para cada réplica, foram produzidas 13 linguiças por tratamento. As amostras foram submetidas a análise de composição centesimal, e no período de 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C), foram analisadas quanto a pH, parâmetros de cor, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), teor de nitrito residual e análises microbiológicas, conforme descrições a seguir.

Caracterização das linguiças frescas com extrato do espinafre

A composição centesimal das linguiças foi determinada 24 horas após sua elaboração, seguindo as metodologias descritas pela AOAC.¹⁵ Umidade (método 925.45 (b)), gordura (método Soxhlet 920.39 (c)), cinzas (método 940.26) e proteína (método 920.152) foram realizadas em triplicata. O pH e o teor residual de nitrito foram avaliados, em triplicata, conforme metodologias descritas para a caracterização dos extratos de espinafre.

Os parâmetros de cor foram avaliados, em triplicata, utilizando colorímetro portátil MiniScan EZ (Hunter Lab, Brasil) através dos parâmetros L^* (luminosidade) (preto (0) a branco (100)), a^* (de verde ($-a^*$) a vermelho ($+a^*$)) e b^* (de azul ($-b^*$) a amarelo ($+b$)), conforme instruções do fabricante. Os parâmetros a^* e b^* foram quantificados, e a partir destes foram obtidos os valores de croma (C^*) e ângulo° Hue.¹⁸

O índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é utilizado para avaliar a oxidação lipídica, e foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Marangoni & Moura,¹⁹ com modificações. Foram utilizados 5 g de amostra de cada formulação, em triplicata, sendo estas homogeneizadas em 30 mL de solução de ácido tricloroacético 7,5%. A mistura foi filtrada em papel filtro qualitativo e uma alíquota de 2 mL do filtrado foi transferida para um tubo de ensaio com 2 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,02 M, o qual foi imerso em banho termostático digital SSD 5L (Solidsteel, Brasil) a 100 °C por 20 minutos. Após, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente e a leitura foi realizada em espectrofotômetro Cirrus 80SA (Femto, Brasil) em comprimento de onda de 532 nm. A curva padrão foi desenvolvida com concentrações de 0,00 a 0,9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de 1,1,3,3-tetraetoxipropeno (TEP). Os resultados foram expressos em mg de malonaldeído (MDA). kg^{-1} de amostra.

Para a contagem de micro-organismos mesófilos aeróbios, bactérias ácido-láticas (BAL), enterobactérias e psicrotróficos foram transferidos, assepticamente, 10 g de amostra de cada formulação para sacos plásticos esterilizados tipo *stomacher*, e adicionados 90 mL de solução salina peptonada a 0,1%. Inoculou-se 0,1 mL das diluições apropriadas na superfície das placas de Petri contendo ágar *platecount* (PCA) para contagem de aeróbios mesófilos, incubadas a 37 °C por 48 horas; ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS) para determinação de BAL, incubadas a 37 °C por 48 horas; ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG), para contagem total de enterobactérias, incubadas a 37 °C por 24 horas, de acordo com Pintado et al.,²⁰ e PCA para contagem de bactérias aeróbias psicrotróficas, incubadas a 10 °C por 10 dias, de acordo com Schilling et al.²¹ As placas que apresentaram colônias foram avaliadas e o resultado foi expresso em log UFC.g⁻¹.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o *software* STATISTICA 14 Trial (Statsoft), pela análise de variância (ANOVA) e comparação de média pelo teste de Tukey a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Caracterização do extrato do espinafre

Em relação ao teor residual de nitrito e nitrato dos extratos de espinafre, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para as amostras EEPC e EE. As amostras EEPC apresentaram teores de $596,99 \pm 0,75$ e $1162,68 \pm 0,44$ mg.kg⁻¹ de teores residuais de nitrato e nitrito, respectivamente; já as amostras de extrato de espinafre (EE) apresentaram $923,22 \pm 0,37$ e $528,34 \pm 0,65$ mg.kg⁻¹ de teores residuais de nitrato e nitrito, respectivamente. A cultura nitrato redutase foi capaz de converter o nitrato em nitrito no extrato de

espinafre, resultando em valores duas vezes maiores de nitrito em EEPC. Para o pH não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) entre as amostras EEPC e EE ($5,72\pm0,05$ e $5,77\pm0,01$, respectivamente).

Caracterização das linguiças frescas produzidas com diferentes conservantes

Não houve diferença significativa entre as formulações ($p>0,05$) em relação a umidade, gordura, proteína e cinzas (Tabela 2). As linguiças elaboradas atenderam aos padrões de identidade e qualidade requeridos para o produto, segundo a legislação brasileira,²² que estabelece os seguintes limites: máximo de 30% de gordura, mínimo de 12% de proteína e máximo de 70% de umidade. Estes resultados confirmam que a adição do extrato de espinafre não alterou as características físico-químicas das amostras, indicando que é possível utilizar o extrato na formulação de linguiças frescas suínas na concentração avaliada.

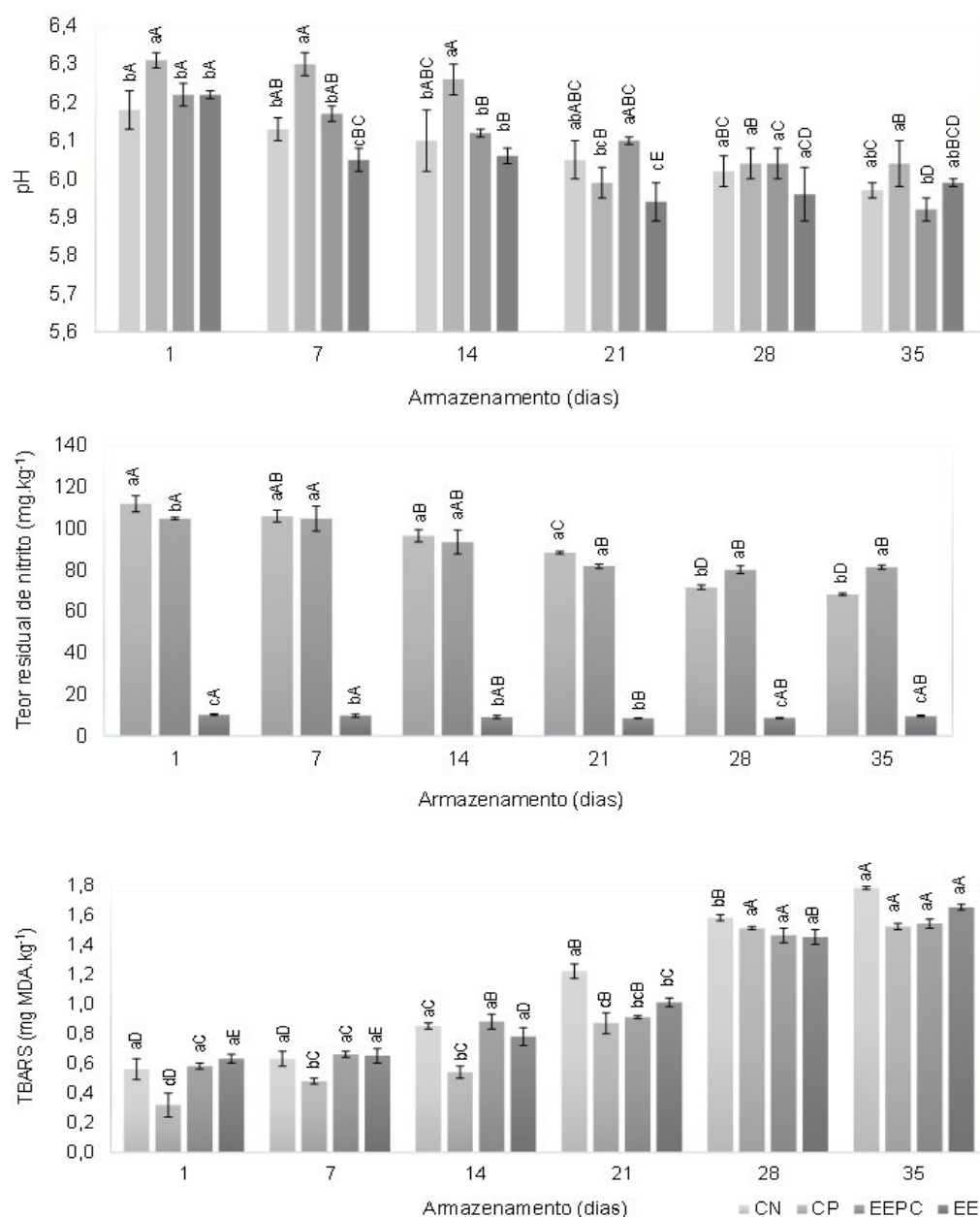
Tabela 2. Composição centesimal das linguiças frescas suínas, durante os 35 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C). Pinhalzinho, SC, 2022.

Amostras	Umidade (%)	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)
CN	64,20±1,58	16,01±0,08	11,08±0,41	2,51±0,07
CP	64,01±2,09	15,98±0,07	11,40±0,23	2,68±0,07
EEPC	64,98±1,24	15,92±0,10	11,36±0,29	2,65±0,20
EE	63,65±1,19	15,94±0,06	11,37±0,54	2,68±0,13

Média ± desvio padrão. Linguiças frescas suínas produzidas com diferentes conservantes: CN-Controle negativo, sem sal de cura; CP - controle positivo com sal de cura; EE - extrato de espinafre; EEPC - extrato de espinafre pré-convertido. As amostras não apresentaram diferença significativa entre si para nenhum dos parâmetros avaliados ($p>0,05$).

Para o pH (Figura 1), observou-se uma diminuição ($p<0,05$) em todas as formulações durante os 35 dias de armazenamento, redução que pode ser atribuída ao aumento da contagem das bactérias ácido-láticas (Tabela 4). Estas bactérias têm como seu produto metabólico o ácido láctico e, consequentemente, a diminuição do pH.²³ Djeri & Williams¹¹ relataram, em seu estudo, a redução do pH da mortadela adicionada de pó de suco de aipo como substituto para o nitrito a partir da terceira semana de armazenamento, devido ao aumento no log UFC.g⁻¹ de bactérias ácido-láticas, resultado semelhante ao encontrado neste estudo.

Figura 1. Resultados das análises de pH, oxidação lipídica pelo método TBARS e teor residual de nitrito das linguiças frescas suínas, durante os 35 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C)



Linguiças frescas suínas produzidas com diferentes conservantes: CN-Control negativo, sem sal de cura; CP - controle positivo com sal de cura; EE - extrato de espinafre; EEPC - extrato de espinafre pré-convertido. Letras minúsculas diferentes em um mesmo tempo de armazenamento apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes entre os tempos de armazenamento apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

Em relação aos parâmetros de cor L^* , C^* e $^{\circ}\text{Hue}$ das linguiças frescas durante os 35 dias de armazenamento (Tabela 3), observou-se um aumento ($p < 0,05$) nos valores de L^* para as amostras CN, EEPC e EE do 1º ao 35º dia, oposto do que era esperado, já que durante o armazenamento de derivados cárneos, sob vácuo, ocorre a oxidação da mioglobina em metamioglobina, de coloração marrom, que resulta no

escurecimento das amostras. Entretanto, alguns fatores como desnaturação proteica e exsudação de água, que são intensificados pela diminuição do pH (Figura 1), podem ter resultado no aumento observado.²⁴

Resultados semelhantes a este estudo também foram relatados por Sucu & Turp⁷ na aplicação de pó de beterraba como substituto ao nitrito em linguiça bovina, a partir de 56 dias de armazenamento.

Em relação aos valores de L^* entre as amostras, para o mesmo dia, observou-se que no primeiro dia não houve diferença significativa ($p>0,05$), entretanto, no último dia de armazenamento, as amostras CP apresentaram menor valor de L^* ($p<0,05$), ou seja, mais escuras. Esta formulação também foi a única que não apresentou variação neste parâmetro ao longo dos 35 dias avaliados, indicando que o sal de cura comercial mantém a estabilidade da cor, o que não foi observado nas demais formulações.

Tabela 3. Parâmetros de cor luminosidade (L^*), tonalidade ($^{\circ}$ Hue) e cromaticidade (C^*) das linguiças frescas suínas, durante os 35 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C). Pinhalzinho, SC, 2022.

	Dias					
Amostra	1	7	14	21	28	35
L^*						
CN	38,21±0,41 ^{aC}	41,99±0,77 ^{aB}	41,87±0,28 ^{abB}	48,04±0,40 ^{aA}	48,27±0,66 ^{aA}	48,31±1,00 ^{aA}
CP	38,64±1,54 ^{aA}	40,97±0,77 ^{aA}	40,58±0,93 ^{bcA}	40,25±1,37 ^{cA}	39,58±0,16 ^{cA}	41,04±0,51 ^{bA}
EEPC	37,65±0,45 ^{aC}	37,93±0,56 ^{bc}	38,90±0,65 ^{cC}	43,68±0,92 ^{bB}	47,07±0,77 ^{abA}	48,74±0,38 ^{aA}
EE	40,16±1,05 ^{aE}	42,27±0,19 ^{aD}	42,83±0,59 ^{aCD}	44,57±0,86 ^{bBC}	45,91±0,45 ^{bAB}	47,23±0,65 ^{aA}
$^{\circ}$Hue						
CN	57,11±1,42 ^{aA}	53,13±0,06 ^{cA}	54,84±1,61 ^{bA}	60,60±0,61 ^{bA}	55,89±1,96 ^{bA}	60,90±1,72 ^{cA}
CP	53,56±0,78 ^{bc}	61,84±1,62 ^{aAB}	60,77±1,85 ^{aBC}	65,58±1,28 ^{aAB}	67,57±0,52 ^{aAB}	68,09±1,68 ^{abA}
EEPC	55,35±0,78 ^{abB}	54,46±0,58 ^{bcB}	64,12±1,42 ^{aA}	67,44±1,56 ^{aA}	65,84±1,54 ^{aA}	71,35±1,70 ^{aA}
EE	57,29±1,12 ^{aC}	55,58±0,68 ^{bc}	60,84±1,48 ^{aB}	65,10±1,42 ^{aA}	65,19±1,64 ^{aA}	65,84±0,72 ^{bA}
C^*						
CN	13,37±0,12 ^{bcABC}	13,95±0,79 ^{aAB}	13,35±1,16 ^{aABC}	14,56±0,36 ^{aA}	12,73±0,28 ^{bBC}	12,04±0,14 ^{bc}
CP	12,91±0,38 ^{cAB}	14,14±0,50 ^{aA}	13,78±0,54 ^{aA}	13,45±0,57 ^{aA}	12,01±0,42 ^{bB}	12,95±0,68 ^{abAB}
EEPC	14,56±0,40 ^{aA}	14,45±1,16 ^{aA}	15,02±0,25 ^{aA}	14,35±0,52 ^{aA}	14,47±0,94 ^{aA}	13,99±0,46 ^{aA}
EE	14,15±0,29 ^{abABC}	14,84±0,39 ^{aA}	14,36±0,61 ^{aAB}	13,41±0,54 ^{aBC}	13,14±0,25 ^{abC}	13,46±0,25 ^{aBC}

Média ± desvio padrão. Linguiças frescas suínas produzidas com diferentes conservantes: CN-Controle negativo, sem sal de cura; CP - controle positivo com sal de cura; EE - extrato de espinafre; EEPC - extrato de espinafre pré-convertido. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa entre as amostras ($p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa entre as amostras ($p<0,05$).

As amostras de linguiça variaram de 53,56° a 71,35°, ou seja, permaneceram entre as cores vermelha (0°) e amarela (90°).²⁵ Os valores de $^{\circ}$ Hue para a formulação CP apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) ao longo dos 35 dias de armazenamento. EEPC apresentou um aumento, e em seguida, após o 14° dia de armazenamento, observou-se estabilização. O mesmo comportamento foi observado na amostra EE, um significativo aumento ($p<0,05$) até o 21° dia de armazenamento. Já para CN, não foi observada diferença significativa ao longo dos 35 dias avaliados ($p>0,05$). A coloração avermelhada das linguiças, observada com mais ênfase nos dias 1 e 7, é devido à formação da oximioglobina.²⁶ O aumento do $^{\circ}$ Hue observado nas

amostras CP, EEPC e EE, que indica um aumento na tonalidade amarelada, está associado às reações oxidativas dos lipídios ligados à formação de polímeros de cor amarelada,²⁷ sendo que os resultados obtidos para a oxidação lipídica no presente estudo (Figura 1) corroboram esta afirmação. Ainda, o aumento do °Hue pode ser atribuído ao pigmento contido no extrato de espinafre, naturalmente verde. Outra possível explicação para esse aumento pode ser consequência da destruição da mioglobina pelo desenvolvimento bacteriano, já que os micro-organismos utilizam a mioglobina como nutriente, desenvolvendo uma coloração esverdeada e/ou amarelada.²³

A saturação está ligada diretamente à concentração do elemento corante e representa um atributo quantitativo. Quanto maior C*, maior a saturação das cores perceptíveis aos humanos.²⁵ Para os valores de C*, de maneira geral, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas amostras avaliadas ao longo dos 35 dias de armazenamento. Cabe ressaltar que as alterações observadas na cor em maiores tempos de armazenamento podem ser solucionadas com uma prática comum realizada pelas indústrias de derivados cárneos, em especial linguiças frescas, que é a utilização de corantes naturais, como o carmim, o que poderia minimizar qualquer rejeição sensorial oriunda do uso do extrato de espinafre.

Os valores para a oxidação lipídica, de todas as linguiças avaliadas, aumentaram aproximadamente 2,5 vezes ($p < 0,05$) durante o período avaliado (Figura 1). Em 35 dias de armazenamento, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre CP e EEPC, ou seja, o extrato pré-convertido foi tão eficiente quanto o sal de cura comercial no controle da oxidação lipídica nas linguiças frescas suínas. Estudos utilizando extrato de espinafre em lombo de porco curado obtiveram efeito protetor semelhante no controle da oxidação dos lipídios em relação ao nitrito sintético.²⁸ Nota-se também que o CN apresentou maior oxidação nos dias 21 e 35 de armazenamento ($p < 0,05$), ou seja, a adição de nitrato/nitrito, na forma de extrato de espinafre ou de sal de cura comercial, é capaz de inibir o processo de oxidação em produtos cárneos.¹ Rosa et al.²⁹ relataram que valores de até 1,59 mg de MDA.kg⁻¹ na carne não são percebidos por análise sensorial e não causam danos à saúde do consumidor. Neste estudo, apenas as amostras de controle positivo (CP) e amostras com extrato de espinafre pré-convertido (EEPC) mantiveram seus valores abaixo de 1,59 mg de MDA.kg⁻¹ para os 35 dias de armazenamento, com isso, teoricamente, do ponto de vista sensorial, possivelmente estariam aptas para o consumo.

O maior teor residual de nitrito ($p < 0,05$) foi encontrado para a amostra CP (Figura 1), no 1º dia de armazenamento, consequentemente, pela própria composição do sal de cura adicionado, que contém nitrato e nitrito de sódio. Aos 7, 14 e 21 dias de armazenamento, a amostra EEPC apresentou valores iguais ao controle positivo ($p < 0,05$). Já ao final do armazenamento (28 e 35 dias), a amostra EEPC atingiu valores maiores do que o CP, ou seja, as amostras com sal de cura diminuíram mais rapidamente o conteúdo de nitrito.

Essa diminuição mais acentuada em CP também foi verificada por Bertol et al.³⁰ em salame com extrato de alecrim e aipo. Ao longo do armazenamento, uma diminuição do teor residual de nitrito foi observada em CP e EEPC ($p < 0,05$). Durante a etapa de cura, o nitrato é reduzido a nitrito e este em óxido nítrico que reage com o ferro da molécula do pigmento heme da carne, resultando na nitrosomioglobina, que é responsável pela formação da coloração rósea típica de produtos cárneos curados.³¹

A linguiça frescal com extrato de espinafre, que não recebeu uma pré-conversão (EE), apresentou baixo teor residual de nitrito do primeiro ao último dia de armazenamento. Este extrato possui altos valores de nitrato e, possivelmente, precisaria de mais tempo (já que a ação das bactérias nitrato-redutoras pode ser lenta) para que a conversão a nitrito ocorresse. A amostra CN não foi apresentada na Figura 1, pois não foi detectado teor residual de nitrito nesta formulação.

As linguiças apresentaram uma concentração inicial (dia 1) de micro-organismos mesófilos de aproximadamente $3,5 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (Tabela 4), valores que se encontram dentro dos parâmetros determinados pela Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022, que estabelece os parâmetros microbiológicos para os alimentos.³² No 35º dia de armazenamento, os tratamentos CP, EEPC e EE não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$), ao contrário do CN, que apresentou maiores contagens de bactérias mesófilas para este dia ($p<0,05$). Esses resultados indicam que os extratos de espinafre e espinafre pré-convertido possivelmente apresentam atividade antimicrobiana semelhante ao sal de cura comercial em linguiça fresca suína refrigerada.

Tabela 4. Contagem de micro-organismos mesófilos, psicrotróficos, bactérias ácido-láticas e enterobactérias ($\log \text{UFC.g}^{-1}$) das linguiças frescas suínas, durante os 35 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C). Pinhalzinho, SC, 2022.

Tempo de estocagem (dias)						
Amostras	1	7	14	21	28	35
Mesófilos						
CN	$3,55 \pm 0,09^{\text{aD}}$	$6,25 \pm 0,10^{\text{aBC}}$	$6,55 \pm 0,17^{\text{aB}}$	$6,33 \pm 0,07^{\text{aBC}}$	$6,04 \pm 0,06^{\text{aC}}$	$7,96 \pm 0,15^{\text{aA}}$
CP	$3,51 \pm 0,12^{\text{aD}}$	$3,89 \pm 0,09^{\text{bCD}}$	$4,61 \pm 0,33^{\text{cC}}$	$5,53 \pm 0,41^{\text{bB}}$	$5,82 \pm 0,46^{\text{aAB}}$	$6,63 \pm 0,33^{\text{bA}}$
EEPC	$3,42 \pm 0,14^{\text{aE}}$	$4,38 \pm 0,43^{\text{bD}}$	$4,90 \pm 0,15^{\text{bcCD}}$	$5,15 \pm 0,12^{\text{bBC}}$	$5,76 \pm 0,21^{\text{aB}}$	$7,04 \pm 0,14^{\text{bA}}$
EE	$3,52 \pm 0,12^{\text{aC}}$	$4,29 \pm 0,24^{\text{bC}}$	$5,46 \pm 0,46^{\text{bB}}$	$6,67 \pm 0,15^{\text{aA}}$	$6,61 \pm 0,18^{\text{aA}}$	$7,05 \pm 0,11^{\text{bA}}$
Psicrotróficos						
CN	$4,29 \pm 0,03^{\text{aC}}$	$7,47 \pm 0,15^{\text{aA}}$	$7,29 \pm 0,01^{\text{aAB}}$	$7,35 \pm 0,20^{\text{abAB}}$	$7,45 \pm 0,04^{\text{aA}}$	$7,61 \pm 0,04^{\text{cA}}$
CP	$4,17 \pm 0,14^{\text{aD}}$	$4,44 \pm 0,11^{\text{cD}}$	$5,21 \pm 0,27^{\text{bC}}$	$6,55 \pm 0,25^{\text{cB}}$	$7,05 \pm 0,05^{\text{bAB}}$	$7,51 \pm 0,05^{\text{bA}}$
EEPC	$4,27 \pm 0,21^{\text{aC}}$	$6,81 \pm 0,04^{\text{bAB}}$	$7,19 \pm 0,19^{\text{aA}}$	$7,09 \pm 0,05^{\text{bA}}$	$6,63 \pm 0,17^{\text{cB}}$	$7,42 \pm 0,09^{\text{bA}}$
EE	$4,28 \pm 0,09^{\text{aC}}$	$7,39 \pm 0,13^{\text{aB}}$	$7,60 \pm 0,14^{\text{aAB}}$	$7,68 \pm 0,19^{\text{aAB}}$	$7,41 \pm 0,05^{\text{aB}}$	$7,92 \pm 0,11^{\text{aA}}$
Bactérias Ácido-Láticas						
CN	$3,14 \pm 0,14^{\text{aC}}$	$5,44 \pm 0,36^{\text{aB}}$	$5,92 \pm 0,14^{\text{bB}}$	$6,25 \pm 0,07^{\text{bB}}$	$6,31 \pm 0,16^{\text{aB}}$	$7,26 \pm 0,15^{\text{aA}}$
CP			$4,68 \pm 0,16^{\text{cC}}$			
	$3,04 \pm 0,12^{\text{aD}}$	$3,41 \pm 0,23^{\text{bD}}$		$5,66 \pm 0,29^{\text{cB}}$	$6,40 \pm 0,23^{\text{aA}}$	$6,50 \pm 0,12^{\text{bA}}$
EEPC	$2,70 \pm 0,09^{\text{aD}}$	$3,65 \pm 0,09^{\text{bC}}$	$4,37 \pm 0,09^{\text{cB}}$	$4,97 \pm 0,09^{\text{dB}}$	$4,86 \pm 0,09^{\text{bB}}$	$6,28 \pm 0,10^{\text{bA}}$
EE	$2,62 \pm 0,15^{\text{aD}}$	$5,85 \pm 0,13^{\text{aC}}$	$6,70 \pm 0,08^{\text{aB}}$	$6,73 \pm 0,09^{\text{aB}}$	$5,23 \pm 0,27^{\text{bE}}$	$7,37 \pm 0,04^{\text{aA}}$
Enterobactérias						
CN	$1,91 \pm 0,13^{\text{aC}}$	$3,30 \pm 0,25^{\text{aB}}$	$4,15 \pm 0,19^{\text{aA}}$	$3,33 \pm 0,05^{\text{aB}}$	$4,29 \pm 0,45^{\text{aA}}$	$4,59 \pm 0,35^{\text{aA}}$
CP	$2,00 \pm 0,13^{\text{aBC}}$	$1,68 \pm 0,33^{\text{cC}}$	$2,02 \pm 0,16^{\text{cBC}}$	$2,31 \pm 0,07^{\text{bAB}}$	$2,45 \pm 0,22^{\text{bAB}}$	$2,75 \pm 0,03^{\text{bA}}$
EEPC	$2,08 \pm 0,26^{\text{aB}}$	$2,23 \pm 0,06^{\text{bcAB}}$	$2,54 \pm 0,23^{\text{cAB}}$	$2,62 \pm 0,32^{\text{bAB}}$	$2,62 \pm 0,11^{\text{bAB}}$	$2,93 \pm 0,54^{\text{bA}}$
EE	$2,20 \pm 0,06^{\text{aD}}$	$2,76 \pm 0,10^{\text{abC}}$	$3,28 \pm 0,37^{\text{bB}}$	$3,72 \pm 0,21^{\text{aAB}}$	$3,81 \pm 0,11^{\text{aA}}$	$4,19 \pm 0,06^{\text{aA}}$

Média \pm desvio padrão. Linguiças frescas suínas produzidas com diferentes conservantes: CN-Control negativo, sem sal de cura; CP - controle positivo com sal de cura; EE - extrato de espinafre; EEPC - extrato de espinafre pré-convertido. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa entre as amostras ($p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa entre as amostras ($p<0,05$).

Em relação às bactérias psicrotróficas (Tabela 4), observou-se aumento significativo ($p<0,05$) para as amostras CN, EEPC e EE do 1º ao 7º dia, e estas, de maneira geral, se mantiveram estáveis ou sofreram um pequeno aumento até o último dia de armazenamento avaliado. A amostra CP apresentou aumento significativo ($p<0,05$) após 14 dias de armazenamento, e aos 35 dias de armazenamento não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) da amostra EEPC, indicando que a adição de EEPC apresentou ação similar ao sal de cura comercial sobre estes micro-organismos.

Os micro-organismos psicrotróficos, embora não previstos na legislação vigente, podem ser utilizados como indicadores de vida de prateleira, uma vez que apresentam bom desenvolvimento em temperaturas de refrigeração, capazes de deteriorar o produto, diminuindo a vida útil de alimentos refrigerados.³³ Miyagusku et al.,³⁴ ao avaliarem cortes de peito de frango irradiados, observaram que em contagens de bactérias psicrotróficas acima de 6 log UFC.g⁻¹ pode haver a formação de limosidade superficial no produto e odor desagradável.

A contagem de bactérias ácido-láticas (Tabela 4), no dia 1, não apresentou diferença significativa entre as formulações ($p>0,05$). Ao longo da vida útil, houve aumento no número de BAL em todas as formulações das linguiças elaboradas. Em 35 dias de armazenamento, as linguiças CP e EEPC apresentaram as menores contagens para este micro-organismo e não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Este comportamento, de elevada contagem para CN e EE em 35 dias de armazenamento, pode ser justificado pelo baixo teor de nitrito ou nenhuma adição desse conservante nessas formulações, o que pode ter ocasionado aumento na produção de BAL.³⁵ Segundo Sukumaran et al.,³⁶ produtos cárneos que apresentam contagens de bactérias ácido-láticas superiores a 7 log UFC.g⁻¹ são impróprios para o consumo; sendo assim, CP e EEPC podem ser consideradas aptas ao consumo após 35 dias de armazenamento.

Para a contagem de enterobactérias (Tabela 4), o mesmo comportamento já relatado para as bactérias ácido-láticas foi observado. Inicialmente, as formulações não apresentaram diferença significativa, e ao longo do tempo, um aumento ($p<0,05$) foi observado em todas as formulações, sendo que CP e EEPC apresentaram os menores valores e não diferiram entre si no 35º dia de armazenamento ($p<0,05$).

Contagens elevadas de enterobactérias podem ser atribuídas à qualidade microbiana da matéria-prima³⁷ e estão geralmente envolvidas na deterioração da carne.³⁸ Estes resultados mostram, mais uma vez, que o extrato de espinafre pré-convertido é tão eficiente quanto o sal de cura comercial na inibição de micro-organismos patogênicos.

CONCLUSÃO

As linguiças frescas suínas utilizando o extrato de espinafre apresentaram características físico-químicas - como umidade, proteína, gordura e cinzas - iguais às linguiças produzidas com sal de cura comercial. O uso do extrato de espinafre pré-convertido mostrou-se mais eficiente no processo de inibição da oxidação lipídica e controle do crescimento de micro-organismos mesófilos, bactérias ácido-láticas e enterobactérias das linguiças frescas suínas, ao longo de 35 dias de armazenamento sob refrigeração, quando comparado com a formulação contendo o extrato de espinafre sem conversão (EE).

Assim, mesmo o espinafre sendo uma excelente fonte de nitrato, para sua utilização em substituição ao nitrito de sódio, uma pré-conversão se faz necessária. O espinafre pode ser considerado uma alternativa promissora para a indústria cárnea, possibilitando o desenvolvimento de produtos com menor conteúdo de aditivos químicos e atendendo a uma demanda crescente por produtos *clean label*, e por consequência, maior saudabilidade. Entretanto, cabe ressaltar que, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, para autorizar o uso de novos aditivos alimentares, é necessária a realização de uma avaliação da segurança, a fim de garantir que o consumo desses aditivos, nas condições e nos limites aprovados, não irá expor a população a um risco relevante.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UDESC-Universidade do Estado de Santa Catarina, à empresa Chr. Hansen e à ICL Food Specialties, pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa

REFERÊNCIAS

1. Flores M, Toldrá F. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products - Invited review. *Meat Science*. 2021 Jan;171:108272. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108272>.
2. Corpet DE. Red meat and colon cancer: should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Science*. 2011 Nov;89(3):310-316. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.009>.
3. Mey ED, Maere HD, Paelinck H, Fraeye I. Volatile N-nitrosamines in meat products: Potential precursors, influence of processing, and mitigation strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017 Sep;57(13):2909-2923. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1078769>.
4. Fraqueza MJ, Borges A, Patarata L. Strategies to Reduce the Formation of Carcinogenic Chemicals in Dry Cured Meat Products. *Food Control and Biosecurity*. 2018 Feb;295-342. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811445-2.00009-X>.
5. Tsoukalas DS, Katsanidis E, Marantidou S, Bloukas JG. Effect of freeze-dried leek powder (FDLP) and nitrite level on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*. 2011 Feb;87(2):140-145. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.10.003>.
6. Hayes JE, Canonico I, Allen P. Effects of organic tomato pulp powder and nitrite level on the physicochemical, textural and sensory properties of pork luncheon roll. *Meat Science*. 2013 Nov;95(3):755-762. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.04.049>.
7. Sucu C, Turp GY. The investigation of the use of beetroot powder in Turkish fermented beef sausage (sucuk) as nitrite alternative. *Meat Science*. 2018 Jun;140:158-166. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.03.012>.
8. Aquilani C, Sirtori F, Flores M, Bozzi R, Lebrete B, Pugliese C. Effect of natural antioxidants from grape seed and chestnut in combination with hydroxytyrosol, as sodium nitrite substitutes in Cinta Senese dry-fermented sausages. *Meat Science*. 2018 Nov;145:389-398. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.019>.
9. Citak S, Sonmez S. effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. *Scientia Horticulturae*. 2010 Oct;126(4):415-420. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.08.010>.
10. Chang AC, Yang TY, Riskowski GL. Ascorbic acid, nitrate, and nitrite concentration relationship to the 24 hour light/dark cycle for spinach grown in different conditions *Food Chemistry* 2013 May;138(1):382-388. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.036>.
11. Djeri N, Williams SK. Celery Juice Powder Used as Nitrite Substitute in Sliced Vacuum-Packaged Turkey Bologna Stored at 4C for 10 Weeks Under Retail Display Light. *Journal of Food Quality*. 2014 Sep;37(5):361-370. <https://doi.org/10.1111/jfq.12102>.
12. Sebranek JG, Bacus JN. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*. 2007 Sep;77(1):136-147. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.025>.
13. Medeiros GA de, Furuta KKD. Agricultura urbana: desenvolvimento de um protótipo para o cultivo de hortaliças em ambiente residencial. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*. 2021 Jan;12(3):651-663. <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.003.0052>.
14. Gardes B, Borsato D, Silva LCN da. Determinação do teor de nitrato em vegetais da região de Londrina por complexação do ácido salicílico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 1986 Dez 15;7(2):60-61. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.1986v7n2p60>.
15. Latimer, GW. Official methods of analysis: of AOAC international. 20 ed. Maryland: AOAC; 2016.

16. Oliveira JF de, Silva UR da, Pastore VAA, Azevedo EC de, Campos GM de, Silva FCG da, et al. Determinação espectrofotométrica de nitrito em produtos cárneos embutidos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* [Internet]. 2017 Mar 20;11(1):19-31. [acesso em 15 mar 2023] Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/377>.
17. Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE, Youngs VL. Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in Plant-Tissue by Nitration of Salicylic-Acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 1975 Jan;6(1):71-80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>.
18. Sehn GAR, Schaefer SV, Schmieles M, Silva BP, Barcia MT, Rodrigues RS. Characterization of pseudo-fruits of *Hovenia dulcis* T. at diferente maturation stages and drying methods. *Acta Scientiarum Technology*. 2021 Jun;43:e50571. <https://10.4025/actascitechnol.v43i1.50571>.
19. Marangoni C, Moura NF de. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum Sativum* L. in Italian salami. *Food Science and Technology*. 2011 Mar;31(1):124-128. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100017>.
20. Pintado T, Herrero AM, Jiménez-Colmenero F, Pasqualin CC, Ruiz-Capillas C. Chia and oat emulsion gels as new animal fat replacers and healthy bioactive sources in fresh sausage formulation. *Meat Science*. 2018 Jan;135:6-13. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.08.004>.
21. Schilling MW, Pham AJ, Williams JB, Xiong YL, Dhowlaghar N, Tolentino AC, et al. Changes in the physiochemical, microbial, and sensory characteristics of fresh pork sausage containing rosemary and green tea extracts during retail display. *Meat Science*. 2018 Sep;143:199-209. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.05.009>.
22. Brasil. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 2000 Abr;6p; Seção 1. [Acesso em 28 fev. 2023]. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/copy_of_suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-carneos-e-seus-derivados-1
23. Alcantara M de, Moraes ICL de, Souza C de MO da CC de. Principais microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. 2012 Jan;6(1):1-20. <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20120001>.
24. Luong NDM, Jeuge S, Coroller L, Feurer C, Desmonts MH, Moriceau N, et al. Spoilage of fresh turkey and pork sausages: Influence of potassium lactate and modified atmosphere packaging. *Food Research International*. 2020 Nov;137:109501. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109501>.
25. Pathare PB, Opara UL, Al-Said FAJ. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*. 2012 May11;6(1):36-60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>.
26. Chakanya C, Arnaud E, Muchenje V, Hoffman LC. Colour and oxidative stability of mince produced from fresh and frozen/thawed fallow deer (*Damadama*) meat. *Meat Science*. 2017 Apr;126:63-72. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.12.008>.
27. Parrini S, Sirtori F, Acciaioli A, Becciolini V, Crovetto A, Franci O, et al. Effect of Replacement of Synthetic vs. Natural Curing Agents on Quality Characteristics of Cinta Senese Frankfurter-Type Sausage. *Animals*. 2019 Dec19;10(1):14. <https://doi.org/10.3390/ani10010014>.
28. Kim TK, Kim YB, Jeon KH, Park JD, Sung JM, Choi HW, et al. Effect of Fermented Spinach as Sources of Pre-Converted Nitrite on Color Development of Cured Pork Loin. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2017 Feb28;37(1):105-113. <https://10.5851/kosfa.2017.37.1.105>.

29. Rosa CS, Kubota E, Stein M, Nogara GP, Vizzoto M. Avaliação do efeito de extrato de farinha de alfarroba (*Ceratonia siliqua* L.) na estabilidade oxidativa e cor de hambúrgueres congelados. *Semina: Ciências Agrárias*. 2013 Out17;34(5):2277-2286. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n5p2277>
30. Bertol TM, Fiorentini AM, Santos MJH, Sawitzki MC, Kowski VL, Agnes IBL, et al. Rosemary extract and celery-based products used as natural quality enhancers for colonial type salami with different ripening times. *Food Science and Technology*. 2012 Oct16;32(4):783-792. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000110>.
31. Moller JKS, Skibsted LH. Nitric Oxide and Myoglobins. *Chemical Reviews*. 2002 Mar;102(4):1167-1178. <https://doi.org/10.1021/cr000078y>.
32. Brasil. Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 2022 6Jul;133p. [Acesso em 23 mar. 2023]. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2
33. Bezerra MVP, Abrantes MR, Silvestre MKS, Sousa ES, Rocha MOC, Faustino JG, et al. Avaliação microbiológica e físico-química de linguiça toscana no Município de Mossoró, RN. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2012 Mai;79(2):297-300. [Acesso em 23 abr. 2023]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/8DmqyKRtNHffWz4xjxvcBR/?format=pdf>.
34. Miyagasku L, Chen F, Leitão MF de, Baffa O. Avaliação microbiológica e sensorial da vida-útil de cortes de peito de frango irradiados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2003 Dez;23:7-16. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612003000400003>.
35. Hospital XF, Carballo J, Fernández M, Arnau J, Gratacós M, Hierro E. Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. *Food Control*. 2015 Nov;57:275-281. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.024>.
36. Sukumaran AT, Holtcamp AJ, Englishbey AK, Campbell YL, Kim T, Schilling MW, et al. Effect of deboning time on the growth of *Salmonella*, *E. coli*, aerobic, and lactic acid bacteria during beef sausage processing and storage. *Meat Science*. 2018 May1;139:49-55. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.01.012>.
37. Honrado A, Ainsa A, Marquina PL, Beltrán JA, Calanche JB. Low-fat fresh sausage from rabbit meat: An alternative to traditional rabbit consumption. *Meat Science*. 2022 Sep;194:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108973>.
38. Fasolato L, Carraro L, Facco P, Cardazzo B, Balzan S, Taticchi A, et al. Agricultural by-products with bioactive effects: A multivariate approach to evaluate microbial and physicochemical changes in a fresh pork sausage enriched with phenolic compounds from olive vegetation water. *International Journal of Food Microbiology*. 2016Jul;228:34-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.003>.

Colaboradores

Cherobin AK participou da concepção e desenho, análise e interpretação dos dados, revisão e aprovação da versão final; Amaral AMP participou da concepção e desenho; Moroni LS participou da análise e interpretação dos dados; Cavalheiro D participou da revisão e aprovação da versão final; Sehn GAR participou na revisão e aprovação da versão final.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Recebido: 17 de maio de 2023

Aceito: 01 de setembro de 2023