



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

CATHARINA CALOCHI PIRES DE CARVALHO

**APLICAÇÃO E VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS
POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS EM EMBUTIDO CÁRNEO
FERMENTADO**

São José do Rio Preto

2014

CATHARINA CALOCHI PIRES DE CARVALHO

**APLICAÇÃO E VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS
POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS EM EMBUTIDO CÁRNEO
FERMENTADO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Guttierres Gomes

São José do Rio Preto

2014

Carvalho, Catharina Calochi Pires de.

Aplicação e viabilidade de micro-organismos potencialmente probióticos em embutido cárneo fermentado / Catharina Calochi Pires de Carvalho -- São José do Rio Preto, 2014
100 f. : il., tabs.

Orientador: Fernando Leite Hoffmann

Coorientador: Raquel Guttierres Gomes

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Alimentos - Microbiologia.
3. Probióticos. 4. Embutidos. 5. Alimentos - Avaliação sensorial.
I. Hoffmann, Fernando Leite. II. Gomes, Raquel Guttierres.
III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.
CDU – 663.12

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

CATHARINA CALOCHI PIRES DE CARVALHO

**APLICAÇÃO E VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS
POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS EM EMBUTIDO FERMENTADO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual
Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Campus de São
José do Rio Preto, para obtenção do título de doutor
em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann
UNESP- São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
UNICAMP- Limeira

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz
UNESP-São José do Rio preto

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade
USP- Pirassununga

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Fazio
IMES- Catanduva

São José do Rio Preto

21 de março de 2014

“Tudo posso naquele que me fortalece”
(Filipenses 4:13)

Dedico este trabalho...

“Aos meus pais Márcio e Mariangela que são meus maiores exemplos, e irmãos Matheus e Felipe, que sempre estiveram ao meu lado. Amo Muito vocês!!”

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter me iluminado durante estes anos, por ter me dado a força, persistência e sua presença constante ao meu lado.

A minha querida família, pais Márcio e Mariangela, irmãos Matheus e Felipe, todo meu reconhecimento, carinho e amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pela oportunidade, amizade, orientação, ensinamentos, dedicação e apoio durante a realização do trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Raquel Guttierres Gomes, pela co-orientação, mas acima de tudo pela amizade, incentivo, dedicação, apoio durante este período.

Ao Prof^o. Dr. Pedro Fernando Romanelli (*in memoriam*) por todos os ensinamentos.

A Fego® alimentos pela doação dos condimentos e sais de cura.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz pelo laboratório e equipamento disponibilizado.

Ao departamento de Engenharia e Ciência de Alimentos, pela oportunidade de participação do curso.

A todos os funcionários da Pós-Graduação e de todo o departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, pela atenção e auxílio na realização deste trabalho.

Ao Centro de Microscopia e Microanálise do IBILCE/UNESP/S.J. do Rio Preto/SP, a Profa. Dra. Lilian Madi-Ravazzi pela captura das imagens no MEV (FAPESP, Proc. 95/06165-1), aos funcionários Rosana Silistino Souza e Luis Roberto Faleiros pela ajuda nas preparações técnicas.

A minha grande amiga Vidiany (Vidy) pela amizade, paciência, ensinamentos e toda ajuda no processamento do embutido.

A minha amiga Tânia pela amizade, companheirismo e auxílio na realização das análises laboratoriais.

As minhas queridas estagiárias Daniele Silveira e Jocinéia Sanches pela amizade, convivência e por toda ajuda durante o projeto.

As amigas e colegas do departamento Juliana Guerra, Luana Faria, Marina Costa, Daiane, Marília, Juliana Ferreira, pelas conversas animadas, discussões científicas, pelo auxílio nos experimentos e pela convivência ao longo do curso.

As minhas amigas (Eliane, Marcela e Melina) que mesmo distantes torceram e apoiaram para a conclusão desse trabalho.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

Os embutidos fermentados, são definidos como mistura de carne magra e gordura, sais de cura, açúcares, especiarias, embutidos em envoltórios e submetidos à fermentação e secagem. A aplicação de micro-organismos probióticos mostra-se promissora para este tipo de produto, pois não sofrem tratamento térmico durante o processamento, assim não afetando a viabilidade dos micro-organismos adicionados. Entretanto existe o desafio, em virtude da sensibilidade dos micro-organismos aos sais utilizados nesse produto, competição com os micro-organismos presentes na carne, resistência à passagem pelo trato gastrointestinal, além de interferir nas características sensoriais dos embutidos fermentados. Diante disso, foram realizados testes de resistência com as bactérias *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* frente aos sais de cura, cloreto de sódio, acidez, sais biliares e antibióticos. As bactérias apresentaram boa viabilidade na presença de sais de cura, porém na presença de cloreto de sódio apenas *E. faecium* apresentou resistência nas 3 concentrações testadas. Os micro-organismos não foram afetados na presença dos sais biliares, permanecendo em concentrações elevadas, porém apresentaram sensibilidade em diferentes concentrações de pH. Na análise de resistência a antibióticos, *E. faecium* apresentou sensibilidade a maioria dos testados, enquanto que o *L. helveticus* apresentou resistência. Após estas análises, foram realizados os processamentos dos embutidos de acordo com as formulações, Formulação 1 (*E. faecium*), Formulação 2 (*L. helveticus*) e formulação 3 (*E. faecium* + *L. helveticus*). Durante o período de maturação até final do processamento foram realizados o monitoramento físico-químico e microbiológico do embutido, onde os mesmos ficaram dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. As formulações 1 e 2 mantiveram-se a viabilidade no final do processamento com 8,2 log UFC/g para *L. helveticus* e 8,4 log UFC/g para *E. faecium*. Após a constatação da viabilidade das bactérias realizou-se a microscopia, a simulação das condições do trato gastrointestinal e análise sensorial dos embutidos. A microscopia eletrônica de varredura dos embutidos permitiu a visualização da colonização das bactérias na estrutura do produto. As bactérias sobreviveram ao teste *in vitro* de passagem pelo trato gastrointestinal, mas reduziram sua concentração final para 5,50 log UFC/g para *E. faecium* e 4,65 log UFC/g para *L. helveticus*. Na avaliação sensorial as formulações 1 e 2 foram consideradas agradáveis pelos provadores, mas a formulação 1 (*E. faecium*) foi mais aceita pelo provadores nos índices de aceitabilidade aparência, aroma e cor. Diante de tudo, as bactérias apresentam características positivas para a parte tecnológica de embutidos, teriam potencial de venda no mercado, porém ainda faltam testes para as bactérias serem classificadas como probióticos.

Palavras-chave: salame, processamento, probióticos, starter, sensorial.

ABSTRACT

Fermented sausages are defined as a mixture of lean meat and fat, the curing salts, sugar, and spices, stuffed into a casing and hung for fermentation and an drying process. The application of probiotic microorganisms shows promise for this type of product, provided that the sausage does not need to be applied to heat treatments during processing, so there not a affecting the viability of microorganisms added. However there is a challenge, due to the sensibility of microorganisms to the curing salts used in this type of product, competition with microorganisms present in meat, resistance to passage through the gastrointestinal tract, besides to interfering sensory characteristics of fermented sausages. Initially were performed resistance tests with the bacteria *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* the front curing salts, sodium chloride, acidity, bile salts and antibiotics. The bacteria showed good viability in the presence of curing salts, but in the presence of sodium chloride only *E. faecium* showed resistance in three concentrations tested. The microorganisms were not affected in the presence of bile salts remaining in high concentrations, but showed sensibility of different concentrations of pH. In the analysis of resistance to antibiotics, *E. faecium* showed sensibility to most tested, while the *L. helveticus* showed resistance. After these analyses, were processed fermented sausages in accordance with the formulations, Formulation 1 (*E. faecium*), Formulation 2 (*L. helveticus*) and Formulation 3 (*E. faecium* + *L. helveticus*). During the ripening until the end of processing were performed physical and chemical and microbiological analysis, where the results were within the in agreement with legislation. The Formulations 1 and 2 were maintained viable at the end of processing with 8.2 log CFU / g of *L. helveticus* and 8.4 log CFU / g for *E. faecium*. After the verification the viability of the bacteria was performed microscopy, simulating the conditions of the gastrointestinal tract and sensory analysis of fermented sausage. The microscopy of fermented sausages allowed the visualization of colonization of the bacteria in the product structure. The bacteria survived passage through the gastrointestinal tract, but reduced its final concentration to 5.50 log CFU / g for *E. faecium* and 4.65 log CFU / g for *L. helveticus*. In sensory evaluation formulations 1 and 2 were considered pleasant by the tasters, but the formulation 1 (*E. faecium*) was accepted by most tasters index acceptability for appearance, aroma and color. Given all, the bacteria present positive characteristics for the technological part of fermented sausages, would have potential to sell on the market, but there are still tests for bacteria are classified as probiotics

Keywords: salami, probiotics, starter, processing, sensory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Fluxograma do processamento do salame.....	37
Figura 02: Salames na câmara de maturação.....	38
Figura 03: Amostras de salame.....	47
Figura 04: Formulário da avaliação sensorial.....	47
Figura 05: Resistências das bactérias frente aos sais de cura.....	50
Figura 06: Teste das bactérias frente a diferentes concentrações de NaCl.....	50
Figura 07: <i>Enterococcus faecium</i> frente à condições ácidas.....	52
Figura 08: <i>Lactobacillus helveticus</i> frente à condições ácidas.....	52
Figura 09: <i>E. faecium</i> frente diferentes concentrações de sais biliares.....	54
Figura 10: <i>L. helveticus</i> frente a diferentes concentrações de sais biliares.....	55
Figura 11: Variação do pH dos embutidos processados.....	59
Figura 12: Monitoramento da atividade de água (aw) dos embutidos processados.....	60
Figura 13: Monitoramento da perda de peso dos embutidos fermentados.....	62
Figura 14: Embutidos no final da maturação.....	63
Figura 15: Viabilidade do <i>L. helveticus</i> durante período de maturação.....	69
Figura 16: Viabilidade do <i>E. faecium</i> durante período de maturação.....	70
Figura 17: Viabilidade das bactérias durante período de maturação.....	71
Figura 18: Microscopia de varredura da matéria-prima carne.....	72
Figura 19: Microscopia de varredura do embutido com adição de <i>L. helveticus</i>	73
Figura 20: Microscopia de varredura do embutido com adição de <i>E. faecium</i>	73
Figura 21: Perfil dos provadores em relação a faixa etária.....	76
Figura 22: Perfil dos provadores em relação ao sexo.....	76
Figura 23: Perfil dos provadores em relação à frequência de consumo de salame.....	77
Figura 24: Representação dos percentuais de aceitação dos atributos avaliados.....	80
Figura 25: Representação da intenção de compra das amostras avaliadas.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Padrões físico-químicos de salame.....	23
Tabela 02: Padrões microbiológicos.....	25
Tabela 03: Micro-organismos utilizados em produtos cárneos.....	27
Tabela 04: Formulação básica para processamento de salame.....	35
Tabela 05: Parâmetros de maturação dos salames.....	38
Tabela 06: Resistências dos micro-organismos aos antibióticos.....	56
Tabela 07: Composição centesimal dos embutidos.....	64
Tabela 08: Resultados das análises microbiológicas durante 28 dias.....	66
Tabela 09: Resultados da simulação <i>in vitro</i> do trato gastrointestinal.....	74
Tabela 10: Aceitação média das amostras de embutido fermentado atribuída pelos provadores, e resultado do teste de Tukey para comparação de médias.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AEAM	Agar Eosina Azul de Metileno
ANOVA	Análise de Variância
ASS	Agar <i>Salmonella Shigella</i>
Aus.	Ausência
BHI	Agar Brain Heart Infusion
BP	Baird Parker
L	Caldo Lactosado
CLT	Caldo Lauril Triptose
cm	Centímetro
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CRA	Capacidade de retenção de água
CSC	Caldo Selenito Cistina
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramma
h	Horas
Kg	Quilograma
máx.	Máximo
mín.	Mínimo
mL	Mililitro
MRS	Ágar Man Rogosa Sharp
nm	Nanômetro
NMP	Número mais provável
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SPS	Sulfito de Polimixina Sulfadiazina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
spp.	Indica que a bactéria pertence a um gênero (que o nome precede essa abreviação), mas não a uma espécie identificada.
T	Temperatura
t ₀	Tempo zero
t ₇	Tempo sete
UFC	Unidades formadoras de colônias
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Produtos cárneos.....	18
3.1.1 Salames.....	19
3.1.2 Matérias-primas e ingredientes utilizados na elaboração de salames.....	20
3.1.3 Padrões físico-químicos para salames.....	23
3.1.4 Padrões microbiológicos.....	25
3.1.5 Cultura <i>starter</i> em salames	26
3.2 Probióticos.....	28
3.2.1 Bactérias probióticas em produtos cárneos	29
3.2.2 <i>Enterococcus faecium</i>	30
3.2.3 <i>Lactobacillus helveticus</i>	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Matéria-prima e ingredientes.....	32
4.2 Métodos.....	32
4.2.1 Teste de sensibilidade das bactérias frente aos sais de cura.....	32
4.2.2 Testes de simulação de condições de estresse.....	33
4.2.2.1 Resistência à acidez.....	33
4.2.2.2 Resistência aos sais biliares.....	34
4.2.3 Teste de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos.....	34
4.2.4 Processamento de salame.....	35
4.2.5 Análises Físico-químicas.....	39
4.2.6 Análises microbiológicas.....	40
4.2.6.1 Preparo das amostras.....	40
4.2.6.2 Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i> (coagulase positiva).....	40
4.2.6.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (35° C).....	41
4.2.6.4 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes (45° C).....	41

4.2.6.5 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	42
4.2.6.6 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	42
4.2.6.7 Viabilidade dos micro-organismos probióticos.....	43
4.2.7 Microscopia.....	44
4.2.8 Sobrevivência dos micro-organismos <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Lactobacillus helveticus</i> no salame durante a simulação das condições gastrointestinais	44
4.2.9. Análise Sensorial.....	45
4.2.10 Análise estatística.....	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Teste de sensibilidade das bactérias frente aos sais de cura.....	49
5.2 Testes de simulação de condições de estresses.....	51
5.2.1 Resistência à acidez	51
5.2.2 Resistência aos sais biliares.....	53
5.3 Teste de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos.....	56
5.4 Processamento de salame.....	58
5.4.1 Análises Físico-químicas.....	58
5.4.1.1 Determinação do pH.....	58
5.4.1.2 Determinação da atividade de água.....	60
5.4.1.3 Determinação da perda de peso.....	61
5.4.1.4 Composição centesimal.....	63
5.4.2 Análises microbiológicas.....	65
5.4.3 Viabilidade dos micro-organismos.....	69
5.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	72
5.4.5 Sobrevivência dos micro-organismos <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Lactobacillus helveticus</i> no salame durante a simulação das condições gastrointestinais.....	73
5.4.6 Análise Sensorial.....	75
5.4.6.1 Caracterização do perfil consumidor.....	75
5.4.6.2 Teste de aceitação.....	78
5.4.6.3 Pesquisa de intenção de compra.....	80
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXO.....	99

1.INTRODUÇÃO

As indústrias alimentícias têm um grande interesse por alimentos que contenham substâncias capazes de influenciar positivamente as atividades fisiológicas, como consequência buscam desenvolver produtos com características funcionais e que tragam benefícios à saúde.

Esses alimentos com efeitos benéficos à saúde humana são denominados funcionais, e podem estar ligados a adição de ingredientes ativos (ERKKILA et al., 2001). Estes podem ser classificados de acordo com os bioativos presentes, como probióticos, fibras, fitoquímicos, vitaminas e minerais essenciais, peptídeos e proteínas dentre outros (ARVANITOYANNIS; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2005). Estes tipos de produtos têm apresentado um crescimento que pode estar relacionado ao custo de vida, crescente expectativa de vida e desejo de melhora na qualidade da vida (SIRÓ et al., 2008).

Dentre os alimentos funcionais, pode-se destacar os probióticos, que são definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO, 2001), e estão presentes em produtos alimentícios, como alguns produtos lácteos, produtos à base de cereais e sucos de frutas (VUYST et al., 2008).

Os probióticos pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e em menor escala *Enterococcus* são comumente empregados em produtos alimentícios.

No setor cárneo, a aplicação de probióticos mostra-se promissora, principalmente em embutidos fermentados como salame, por exemplo, por não passarem por tratamento térmico durante o processamento e consequentemente não causando a morte dos micro-organismos (ERKKILA et al., 2001). Entretanto, estes

devem ser resistentes ao cloreto de sódio e sais de cura adicionados na formulação (PAPAMANOLI et al., 2003). Além de resistir ao processo de fermentação e sobreviver a passagem pelo estômago e intestino delgado, para assim exercer ações benéficas no organismo (LUCKE, 2000).

Neste contexto, o intuito da pesquisa foi utilizar os micro-organismos *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* em processamento de salame, e avaliar os efeitos dessa aplicação sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade da elaboração de embutido cárneo fermentado por micro-organismos potencialmente probióticos.

2.2. Objetivos específicos

- Testar a capacidade das culturas potencialmente probióticas *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus*, de desenvolver em concentrações de sais de cura usualmente empregadas nos produtos cárneos fermentados,
- Testar a sensibilidade das culturas *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* frente a diferentes antibióticos,
- Aplicar testes de resistência aos micro-organismos potencialmente probióticos com a exposição a condições típicas encontradas no trato gastrointestinal,
- Realizar testes preliminares para determinar a melhor concentração da cultura a ser adicionada aos processamentos;
- Acompanhar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos durante a maturação dos embutidos;
- Verificar através da análise de microscopia eletrônica de varredura a estrutura do produto e a presença dos micro-organismos,
- Avaliar a viabilidade e resistência dos micro-organismos potencialmente probióticos adicionados em embutidos através de simulações de condições gástricas.
- Aplicar teste sensorial dos embutidos e avaliar a aceitabilidade do produto.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos cárneos

Carnes são denominadas como as partes musculares comestíveis das diferentes espécies de animais de açougue, manipuladas em condições higiênicas, provenientes de animais sãos e certificados pelo serviço de inspeção (BRASIL, 2005). As carnes podem ser consumidas *in natura* ou serem industrializadas em uma infinidade de produtos.

Os produtos da industrialização da carne são os que sofrem um ou mais tipos de processo, como, cozimento, cura, salga, defumação ou crus com a adição de condimentos e temperos (ORDONÉZ et al., 2005). O processamento da carne fresca tem como objetivo, aumento da vida de prateleira e elaboração de novos produtos.

Dentre os produtos cárneos, os embutidos têm importante espaço no mercado, uma vez que fazem parte dos hábitos alimentares de grande parte dos consumidores brasileiros. As principais variações nestes produtos são a qualidade, o preço e as características sensoriais (RAMUNDO; COUTO; LANZILLOTTI, 2005).

Conforme o Ministério da Agricultura (BRASIL, 1997), os produtos embutidos são definidos como todo produto preparado com carne, órgãos/ vísceras comestíveis e condimentados, podendo ou não ser cozidos, curados, maturados, dessecados, contidos em envoltórios naturais ou artificiais.

Pardi et al. (2001) classificam os produtos embutidos em:

- embutidos de massa cozida a seco - de cozimento lento, em estufas; como mortadelas e salsichas;
- embutidos de massa escaldada – de cozimento rápido, por imersão em água quente, como patês;

- embutidos de massa crua ou semi-crua dessecados - com dessecação parcial maturados; como salames tipo italiano e milano;
- embutidos de massa crua ou semi-crua brandos - menor grau de dessecação; do tipo paio;
- embutidos de massa crua ou semi-crua frescais - de consumo imediato e de guarda sob refrigeração; como linguças.

3.1.1 Salames

De acordo com a legislação Brasileira (BRASIL, 2000), o salame é um produto cárneo obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado e dessecado que poderá ou não ser submetido à defumação. Nesta legislação, de regulamento de identidade e qualidade do salame, estão definidos oito tipos de salames, tipo italiano, tipo milano, tipo hamburguês, tipo calabrés, tipo friolano, tipo alemão, tipo napolitano e salaminho, que se diferenciam pela matéria-prima utilizada, granulometria da carne e toucinho, e na condimentação.

A fabricação de um salame fermentado compreende duas fases: a fermentação e a maturação. Na primeira, ocorre a fermentação com a acidificação e a formação de cor durante sete dias e a segunda fase que consiste da desidratação com duração de aproximadamente vinte e três dias ou mais (TERRA, 2004).

O processamento de salame é o resultado de mudanças bioquímicas, microbiológicas, físicas e sensoriais que ocorrem na mistura de carne durante a maturação sob condições de temperatura e umidade relativa controlada (CASABURI et al., 2007)

As transformações na fabricação do salame ocorrem nas seguintes etapas: alteração na microbiota inicial, decréscimo nos valores do pH, redução de nitratos em nitritos com formação de mioglobina nitrosa, solubilização das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, proteólise, lipólise e fenômenos oxidativos, além da desidratação (LIZASO et al., 1999).

De acordo com Cavenaghi e Oliveira (1999), a fermentação é a etapa mais importante no processamento do salame, por produzir o ácido láctico com consequente diminuição do pH. A fermentação também é responsável por influir no sabor do produto final e o baixo pH contribui para a textura e conservação do produto.

Garcia; Gagleazzi e Sobral (2000) descrevem a importância da etapa de secagem, onde os embutidos perdem de 30 a 40% de seu peso inicial. A perda de umidade deve ser gradual para evitar a formação de rugosidade, ressecamento excessivo da casca e desprendimento da tripa.

No final do processo de fermentação e maturação os valores de pH que devem ser o mais próximos da faixa de 5,2 – 5,4 e a atividade de água igual a 0,87, para manter o produto com as características próprias. Para que estes parâmetros estejam presentes no produto final vale destacar que ambas as fases ocorrem em câmaras de maturação sob condições de umidade relativa, temperatura e velocidade do ar controlada (FERNÁNDEZ et al., 2001).

3.1.2 Matérias-primas e ingredientes utilizados na elaboração de salames

Segundo a legislação brasileira vigente são definidos como ingredientes obrigatórios para o processamento de salame: a carne suína, ou bovina e suína, toucinho e sais de cura. Também podem ser adicionados ingredientes opcionais como: carne

bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas, aditivos intencionais, vinho, condimentos, aromas, especiarias e substâncias glaceantes (BRASIL, 2000).

A matéria-prima principal a ser utilizada na elaboração de salames deverá ter um pH normal de 5,5-5,8, e uma baixa concentração de micro-organismos indesejáveis. As carnes com elevado pH tipo DFD (dark, firm, dry) podem prejudicar a diminuição do pH do embutido, favorecendo a multiplicação de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Enquanto que a utilização de carnes tipo PSE (pale, soft, exudative) pode resultar em defeitos de dessecação do produto final, além de tornar o produto com uma cor mais clara que a tradicional (PRANDL et al., 1994).

A gordura presente na carne conforme o tipo de corte a ser utilizado ou ainda pela adição de toucinho (gordura dorsal) apresentam funções tecnológicas importantes na produção de salames, contribuindo para a textura e suculência do produto, sendo que a qualidade e a quantidade de gordura adicionada podem alterar a qualidade final do produto (AHMAD; SRIVASTAVA, 2007).

Ferreira e Camargo (1993) citam a importância dos ingredientes chamados obrigatórios, como os nitritos e/ou nitratos adicionados no processamento de salames, pois além de conferir coloração avermelhada, devido a reações com a mioglobina da carne, também auxiliam na inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos (*Clostridium botulinum*), na proteção contra oxidação lipídica e na formação de sabor e aroma típicos de produto curado (SILVA, 1999).

Normalmente utiliza-se de 2,5 a 3,0% de cloreto de sódio (sal) na massa de embutido. O sal adicionado atua em diversas funções, como agente de cura, conservante diminuindo a atividade de água do produto, ajuda na extração de proteínas, e também como flavorizante contribuindo para o sabor do produto curado (TOLDRÁ, 2007).

O uso de aditivos em carnes e produtos cárneos ditados pela legislação Brasileira regulamenta o limite de 150 ppm para nitrito de sódio e/ou potássio e 300 ppm para o uso de nitrato de sódio e/ou potássio, sendo ambos expressos como quantidade residual máxima de nitrito (BRASIL, 1998).

Para que estes aditivos produzam os efeitos desejados, devem sofrer algumas transformações. O nitrato (NaNO_3) adicionado na massa cárnea é reduzido a nitrito (NaNO_2) pela ação de enzimas nitrato redutases produzidas por bactérias, presentes naturalmente na carne ou adicionadas. Após isso, e em condições de pH entre 5,4-6,0, o nitrito é reduzido a ácido nitroso (HNO_2) e posteriormente a óxido nítrico (NO) (TERRA, 1998). No final o óxido nítrico reage com a mioglobina, formando um complexo estável denominado de nitrosomioglobina, e que confere a coloração vermelha característica em carnes curadas (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Os açúcares utilizados sempre em pequenas quantidades em quase todos os produtos cárneos proporcionam melhor aroma. Além dessa característica são utilizados como fonte de energia para o desenvolvimento de micro-organismos desejáveis durante o processamento principalmente de salames (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A fermentação dos açúcares pelos microrganismos leva a produção de ácidos (lactato e piruvato), que provocam uma redução no pH da massa cárnea. Com a acidificação do meio ocorre a inibição do crescimento de micro-organismos indesejáveis e também permite o desenvolvimento de reações desejáveis que atuam na formação de cor dos salames. Entretanto, a adição exagerada de açúcares leva ao desenvolvimento de sabor ácido no produto, não sendo característico em salame (TERRA, 1998).

A quantidade e a variedade de açúcares (glicose, frutose, sacarose, maltose e lactose) que podem ser adicionados no processamento de salames variam bastante, e

estão diretamente ligados à velocidade de multiplicação das bactérias ácido lácticas, ou seja, quanto maior o peso molecular do carboidrato, menor a velocidade de fermentação (LUCKE, 1998).

Diversos tipos de condimentos podem ser utilizados na formulação e são responsáveis pelo sabor e odor característico ao produto. Dentre os condimentos mais utilizados é possível citar: pimenta branca e preta, pimentão, cebola, alho, noz moscada, cominho, aipo, cravo da índia, oréganos e vinho tinto (LORENZO et al., 2000).

3.1.3 Padrões físico-químicos para salames

As características físico-químicas, além de fornecer informações nutricionais, também são utilizadas para avaliar a qualidade do produto. Na Tabela 01, pode-se observar os padrões físico-químicos de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame (BRASIL, 2000).

Tabela 01: Padrões físico-químicos de salame

CARACTERÍSTICAS	VALORES
Atividade de água (Aw)	Máx. 0,92
Umidade	Max. 40%
Gordura	Máx. 35%
Proteína	Mín. 20%
Carboidratos totais	Máx. 4%

Fonte: Brasil, 2000.

A atividade de água é um dos fatores mais importantes para o crescimento microbiano, sua diminuição torna-se um obstáculo sobre o crescimento de micro-organismos indesejáveis ao embutido cárneo, como consequência, confere estabilidade ao produto (TYOPPONEN et al., 2003).

De acordo com Shimokomaki et al. (2006) os teores de umidade, gordura e proteína são componentes considerados substratos primários, pois influenciam na matéria-prima utilizada para os processamentos. A porcentagem destes componentes, seu tipo e seu estado físico-químico atuam nos parâmetros de qualidade que determinarão a qualidade final dos produtos.

A umidade tem grande influência na qualidade da carne, contribuindo para textura, suculência, cor, sabor e principalmente para sua estabilidade físico-química e microbiológica (LAWRIE, 1974; CAMARGO, 1984).

As carnes apresentam grande variação no teor de lipídeos presentes, o qual é influenciado por vários fatores, tais como sexo, raça e alimentação do animal, além do corte cárneo. Os lipídeos de búfalos, bovinos e ovinos possuem maior proporção de ácidos graxos saturados, enquanto que em suínos e aves a maior concentração é de ácidos graxos insaturados (PRÄNDL et al., 1994).

Os lipídeos conferem características desejáveis de suculência, sabor e aroma, entretanto são facilmente oxidáveis, levando à formação de produtos indesejáveis, como peróxidos, alterações de cor e sabor (PARDI et al., 2001).

Segundo Forrest et al. (1979) e Torres et al. (1998) e a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados provoca o desenvolvimento de rancidez oxidativa, sendo esta uma das principais causas de deteriorações no armazenamento de carnes ou seja define a vida útil na medida que gera produtos indesejáveis do ponto de vista sensorial, além de destruir vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais.

As proteínas da carne apresentam alto valor biológico, determinado pelo seu conteúdo em aminoácidos essenciais (ANDRADE, 2006). São responsáveis pelas características funcionais das carnes, que determinam o rendimento, qualidade, estrutura e atributos sensoriais dos produtos cárneos (SHIMOKOMAKI et al., 2006).

3.1.4 Padrões microbiológicos

Toda cadeia produtiva, ou seja, desde a obtenção da matéria-prima, higienização de equipamentos e utensílios, todas as etapas de processamento, as condições higiênico-sanitárias dos manipuladores e o armazenamento do produto acabado devem ser controlados a fim de evitar contaminação por micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos.

Visando à segurança alimentar e a saúde dos consumidores, a legislação brasileira estabelece limites para a presença de micro-organismos em salames (BRASIL, 2001), conforme apresentado na Tabela 02.

Tabela 02: Padrões microbiológicos

MICRO-ORGANISMOS	TOLERÂNCIA
Coliformes a 45°C	10 ³ NMP/g
Estafilococos coagulase positiva	5x10 ³ UFC/g
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência em 25g

Fonte: Brasil, 2001

O gênero *Staphylococcus* abrange cerca de 30 espécies de interesse na área de alimentos, e possuem como características peculiares células em forma de cocos Gram positivos, as quais se agrupam aos pares em pequenas cadeias ou em cachos semelhantes aos de uva (FORSYTHE, 2002).

Os *Staphylococcus* são anaeróbios facultativos com habilidade para desenvolver-se numa faixa de temperatura de 7,0-47,8°C (JAY, 2005). Toleram altas concentrações de cloreto de sódio, são resistentes aos nitratos, se desenvolvem em pH de 4,0 a 9,8, e atividade de água baixa (0,83), podendo estar presentes em salames quando não tomados os devidos cuidados.

Estes patógenos têm grande importância na saúde pública podendo estar presentes em alimentos e são transmitidos pelo homem e animais de sangue quente, e sua toxidade é atribuída a produção de enterotoxinas (JAY, 2005).

Franco e Landgraf (2003) citam o grupo dos coliformes totais como constituído por bactérias em forma de bastonetes Gram negativos, não esporuladas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás, quando incubadas por 24 e 48 horas a 35°C.

Os coliformes termotolerantes são também bastonetes Gram negativos, não-esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás (SILVA et al., 2010). Dentre os coliformes termotolerantes, o de maior importância em alimentos é a *Escherichia coli*, que quando presente indica condições higiênico-sanitárias insatisfatórias.

As bactérias do gênero *Salmonella* são bastonetes Gram negativos, não esporulados, mesófilos, anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de desenvolvimento à 37 °C. Tem ampla distribuição na natureza, sendo o trato intestinal do homem e animais seu habitat natural (PARDI et al., 2001; JAY, 2005).

As Salmonelas apresentam ótimo desenvolvimento em pH próximo da neutralidade, entretanto, valores extremos tem ação bactericida. Toleram concentrações de cloreto de sódio superior às utilizadas nas formulações de salames, porém são sensíveis ao nitrito (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

3.1.5 Cultura *starter* em salames

Terra (1998) relatou que inicialmente, a fermentação dos salames ocorria por meio dos micro-organismos contaminantes presentes na matéria-prima sobre os

açúcares presentes na formulação do produto, porém a qualidade dos salames não era uniforme, em função da variação da microbiota contaminante presente. Em 1961, tornou-se difundida a utilização de culturas puras selecionadas, possibilitando assim, o processamento de salames de alta qualidade reproduzível.

Estas culturas, disponíveis comercialmente, são chamadas de *starters* ou cultivos iniciadores, sendo, portanto, preparações de micro-organismos vivos capazes de desenvolverem atividade metabólica na carne (TYOPPONEN et al., 2003). São caracterizadas por assegurarem a qualidade e a segurança de produtos cárneos fermentados, apresentam propriedades de não serem patogênicas, não produzirem toxinas, são competitivas frente a micro-organismos contaminantes e possuem capacidade enzimática condizente com o produto final (HOLZAPFEL et al., 1995).

A Tabela 03 apresenta as espécies de micro-organismos mais utilizados em produtos cárneos fermentados.

Tabela 03: Micro-organismos utilizados em produtos cárneos

MICRO-ORGANISMOS	GÊNEROS E ESPÉCIE
Bactérias lácticas	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. alimemtaris</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. sakei</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Actinobacteria	<i>Kocuria varians</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Bifidobacterium sp.</i>
Staphylococcus	<i>S.xylosus</i> , <i>S.carnosus subsp. carnosus</i> , <i>S. carnosus subsp. utilis</i> , <i>S. equorum</i>
Halomonadaceae	<i>Halomonas elongata</i>
Enterobactérias	<i>Aeromonas sp.</i>
Bolores	<i>Penicillium nalgiovense</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. camemberti</i>
Leveduras	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida famata</i>

Fonte: HAMMES; HERTEL, 1998.

3.2 Probióticos

Os probióticos inicialmente eram definidos como “suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal” (FULLER, 1989). Entretanto atualmente a definição mais aceita internacionalmente é que são micro-organismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001).

A legislação Brasileira para alimentos probióticos estabelece uma recomendação com base na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos funcionais, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC/dia (BRASIL, 2008).

Heenan et al. (2002) ressaltaram os possíveis benefícios à saúde pela ingestão diária de probióticos, destacando que melhoram o trânsito intestinal facilitando a digestão, diminuem os sintomas de intolerância à lactose, melhoram na resposta imune, podem reduzir sintomas de diarreia, previnem câncer de cólon e redução do colesterol.

Para identificar, caracterizar e classificar as bactérias como probióticas estas devem apresentar as seguintes propriedades (SUSKOVIC et al., 2001; ANNUK et al., 2003): identificação taxonômica, serem habitante normal das espécies alvo (origem humana para probióticos humanos), não serem tóxicas e patogênicas, apresentarem capacidade de sobreviver, proliferar e estimular a atividade metabólica no trato gastrointestinal, possuírem viabilidade populacional elevada, apresentando contagens em torno de 10^6 - 10^8 bactérias por grama de produto, capacidade de exercer efeitos benéficos à saúde e fornecer qualidades organolépticas sensoriais desejáveis (FAO, 2001).

As bactérias probióticas utilizadas em escala industrial e de processamento devem ser apropriadas para cada tipo de produto e apresentar boa viabilidade, eficácia terapêutica, além de permanecer em um número elevado durante a vida de prateleira do produto, a fim de garantir que o número de micro-organismos probióticos chegue ao trato intestinal e produzam os efeitos benéficos ao organismo humano (REID et al., 2003, STANTON et al., 2005).

3.2.1 Bactérias probióticas em produtos cárneos

Em produtos cárneos, a utilização de probióticos mostra-se promissora em produtos crus fermentados, como o salame, que são produtos que não sofrem nenhum tratamento térmico ao serem consumidos, mantendo assim, a viabilidade destes micro-organismos (ERKKILA et al., 2001). Entretanto, os micro-organismos probióticos adicionados nesse tipo de produto devem ser capazes de resistir ao sal, especiarias e outras substâncias adicionadas na formulação (SAMESHIMA et al., 1998).

Quando os probióticos são aplicados em fermentados cárneos pressupõe-se que estes sejam viáveis na presença de sais de cura, apresentem resistência ao pH baixo e a baixa atividade de água, cresçam rapidamente e sejam facilmente cultiváveis em escala industrial, contribuindo assim, para a qualidade sensorial do produto (VUYST et al., 2008).

Macedo; Pflanze e Gomes (2011) citam que as culturas probióticas podem ser adicionadas nos embutidos como parte integrante da cultura starter ou como cultura adicional à cultura starter durante a mistura da massa.

3.2.2 *Enterococcus faecium*

O gênero *Enterococcus* faz parte do grupo das bactérias ácido lácticas, são bactérias Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, cocos anaeróbios facultativos que podem ocorrer isoladamente, em pares ou em cadeias. Podem ser cultivados na presença de altas concentrações de sal (NaCl a 6,5%) e toleram sais biliares a 40% (FACKLAN, et al. 1999).

Os *Enterococcus* podem ser encontrados no solo, água, alimentos, plantas, animais e insetos. Seu desenvolvimento possivelmente ocorre pela disseminação através das fezes dos animais de sangue quente e por sua capacidade em sobreviver em condições extremas de temperatura e altas concentrações de sal (HARDIE; WHILEY, 1997).

Esses micro-organismos têm sido utilizados na indústria com diferentes aplicações, como culturas starter em silagens, leite, queijos e salames (GIRRAFA et.al, 1997). Sarantinopoulos et al. (2002) relatam que os enterococcus em salames, possivelmente podem contribuir para a aromatização através de suas atividades glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas.

Algumas bactérias do gênero *Enterococcus*, tais como o *E. faecium* e o *E. faecalis* estão sendo classificadas como probióticos em alguns países (FRANZ et al., 2003). De acordo com a legislação, o *E. faecium* faz parte da lista dos micro-organismos probióticos (BRASIL, 2008).

3.2.3 *Lactobacillus helveticus*

O gênero *Lactobacillus* é composto por bacilos Gram-positivos, regulares e não esporulados. Compreendem cerca de 56 espécies, sendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* as mais utilizadas para fins alimentares (SNEATH et al., 1986). Está diretamente relacionado com o sistema imune e inibição de patógenos como o *Clostridium perfringens*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *S. aureus* e *Salmonella* spp.

O *Lactobacillus helveticus* é uma bactéria ácido láctica termófila de grande interesse na área de laticínios, destacando-se pela produção de ácido láctico e atividade lipolítica e proteolítica (ARNAUD; GIRAUD, 1985). Apresenta bom crescimento entre 40 a 45°C, entretanto, não se desenvolve em temperaturas inferiores a 15°C. Geralmente resiste a temperaturas de 60°C por 90 minutos.

Estudos mostram que algumas estirpes de *Lactobacillus helveticus* podem promover benefícios à saúde humana. Estes estudos *in vitro* mostraram que *Lactobacillus helveticus* apresenta propriedades probióticas como, capacidade de sobrevivência no trânsito gastrointestinal, adesão a células epiteliais e antagonismo à patógenos (TAVERNITI; GUGLIELMETTI, 2012).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima e ingredientes

Para o processamento dos embutidos fermentados foram adquiridas as cepas de *Enterococcus faecium* (ATCC 8459) e *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009) da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello.

Os condimentos e os sais de cura utilizados na formulação foram cedidos pela Fego® e as carnes suínas (pernil e toucinho) adquiridos no comércio local de São José do Rio Preto-SP.

4.2 Métodos

4.2.1 Teste de sensibilidade das bactérias frente aos sais de cura

As cepas de *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* foram testadas quanto à resistência as concentrações de cloreto de sódio (1,0%, 2,0% e 3%) e de nitrito/nitrato de sódio (0,1%), e estas concentrações foram adicionadas ao ágar, conforme a metodologia descrita a seguir:

As culturas foram repicadas em tubos de ensaio contendo, aproximadamente, 10 mL de caldo BHI/ MRS e incubadas a 37°C por 24 horas para reativação. Posteriormente, procedeu-se a diluição dos inóculos das bactérias avaliadas em água peptonada 0,1% até a 10⁻⁸. Em seguida semeou-se 1mL dessa concentração em placas de Petri contendo ágar BHI para *Enterococcus faecium* e ágar MRS para *Lactobacillus helveticus*, adicionado de diferentes concentrações de sais. Em paralelo foi semeado

1mL dos inóculos em ágar (BHI/ MRS, para o teste controle) para acompanhamento do crescimento (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). As placas foram incubadas em estufa a 37°C, durante 24/48 horas. Os resultados foram expressos em log UFC/mL e comparados com o teste controle.

4.2.2 Testes de simulação de condições de estresse

O potencial probiótico das bactérias *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* foi avaliado em relação à resistência a acidez e aos sais biliares, em condições similares às encontradas no trato gastrointestinal. Para tanto foram utilizadas as seguintes metodologias:

4.2.2.1 Resistência à acidez

Para realizar o teste de resistência à acidez, as bactérias foram reativadas em caldo BHI/MRS a 37°C por 24/48 horas. Em seguida alíquotas de 1 mL dessa suspensão foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril com pH ajustado para os valores 3, 4 e 5 utilizando solução ácido clorídrico (HCl) 8M (ERKKILÄ; PETAJA, 2000). A solução foi preparada pela dissolução de 9 g/L de cloreto de sódio, 9 g/L de fosfato de sódio e 1,5 g/L de fosfato de potássio em água destilada. Os tubos foram incubados a 37°C e a contagem do número de células viáveis foi realizada após a exposição da bactéria à solução salina pelos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 horas, utilizando placas de Petri contendo ágar BHI para *E. faecium* e ágar MRS para *L. helveticus*. A contagem foi realizada após incubação à 37°C por 24/48 horas e os resultados expressos em log UFC/mL.

4.2.2.2 Resistência aos sais biliares

Para realizar o teste de resistência aos sais biliares, as bactérias foram reativadas em caldo BHI/MRS a 37°C por 24/48 horas, em seguida, 1mL dessa suspensão foi inoculada em tubos de ensaio contendo 9 ml de caldo BHI/MRS adicionado de 0.0, 0.15 e 0.30% de sais biliares. Os tubos foram incubados a 37°C e a contagem foi realizada após 0, 1, 2, 3 e 4 horas de exposição dos microrganismos ao caldo com os sais biliares, utilizando placas de Petri contendo ágar BHI/MRS. A contagem foi realizada após incubação à 37°C por 24/48 horas e os resultados expressos em log UFC/mL (ERKKILÄ; PETAJA, 2000).

4.2.3 Teste de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos

Foram realizados testes com as bactérias *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* frente a antimicrobianos pelo método de disco-difusão, conforme metodologia Bauer et al. (1966), onde o inóculo foi preparado na escala 0.5 McFarland e semeado em Ágar Mueller-Hinton (MHA) e MRS, em seguida, as placas foram incubadas por 24/48 horas à 37°C.

Os antibióticos utilizados foram: ampicilina (10mcg), penicilina (10mcg), linezolida (30mcg), vancomicina (30mcg), gentamicina (10mcg), estreptomicina (10mcg), ciprofloxacina (5mcg), Levofloxacina (5mcg), norfloxacina (10mcg), nitrofurantoína (300mcg), tetraciclina (30mcg), clindamicina (2mcg), eritromicina (14mcg), azitromicina (15mcg), amoxicilina (30mcg), cloranfenicol (30mcg), cefoxitina (30mcg), oxacilina (1mcg) e amicacina (30mcg).

4.2.4 Processamento de salame

Os experimentos foram realizados no laboratório de Tecnologia de Produtos Cárneos e Microbiologia de Alimentos, do Campus da UNESP de São José do Rio Preto.

Para o processamento dos embutidos fermentados cárneos foi utilizado uma formulação básica de acordo com a Tabela 04, constituindo 3 formulações onde diferiram a cultura *starter* utilizada:

- Formulação 01: formulação básica + *Enterococcus faecium*
- Formulação 02: formulação básica + *Lactobacillus helveticus*
- Formulação 03: formulação básica + *Enterococcus faecium* + *Lactobacillus helveticus*

Tabela 04: Formulação básica utilizada para processamento de salame

Matéria-prima	Quantidade (%)
Pernil suíno	80%
Toucinho	20%
Ingredientes	Quantidade relativa ao total de matéria-prima (%)
Condimentos para salame (Fego®)	4
Sais de cura (Fego®)	0,1

Ensaio 1:

Inicialmente foi realizado um processamento do embutido cárneo fermentado adicionado com as bactérias separadamente (Formulação 1 e Formulação 2) com objetivo de verificar qual seria a concentração inicial de bactérias a ser aplicada nas formulações para a realização dos ensaios propostos. Já que a legislação em vigor

preconiza uma contagem de 10^8 a 10^9 UFC/g no produto final para ser considerado probióticos.

Ensaio 2:

Com os resultados positivos para viabilidade do ensaio 1, os mesmos foram processados novamente para realização do controle microbiológico e físico-químico.

Ensaio 3:

Resolveu testar a interação entre as bactérias no processamento embutido cárneo fermentado (Formulação 3).

Ensaio 4:

No processamento final das 3 diferentes formulações (Formulação 1, 2 e 3), optou-se pela continuação do projeto apenas com os processamentos com as bactérias separadas, em virtude da diminuição da concentração microbiana das bactérias combinadas.

Preparo das culturas:

As culturas de *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* foram reativadas em 50 mL dos caldos BHI para *E. faecium* e MRS para *L. helveticus*, e incubados à 37°C por 24/48 horas. Em seguida, foram inoculadas em 500 mL de caldo BHI/MRS à 37°C por 24/48 horas. Procedeu-se então, a centrifugação do volume total do caldo em centrífuga refrigerada à 4°C (Jouan GR 2022) com velocidade de 8000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 30 ml de água estéril, e adicionado à massa cárnea.

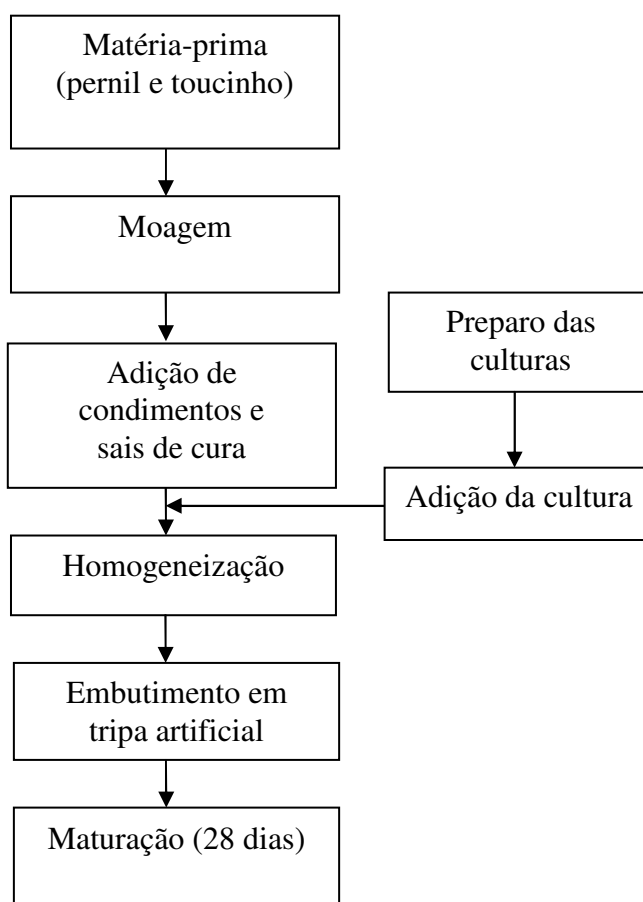
Processamento do embutido cárneo fermentado:

A Figura 01 representa o processamento do salame. Este iniciou-se pela moagem do pernil e do toucinho, seguido da mistura da massa cárnea com os condimentos e sais

de cura e por último, a adição de 30mL de cultura starter de *Enterococcus faecium* ou *Lactobacillus helveticus* reativada.

O embutimento foi realizado em embutideira manual, utilizando tripa artificial de colágeno (calibre 45), previamente lavada em solução de ácido láctico a 1% para promover a limpeza e facilitar a aderência à massa. Cada embutido apresentou peso de aproximadamente 200 gramas.

Figura 01: Fluxograma do processamento do salame



Após o embutimento os salames foram identificados e maturados em câmaras sob controle de temperatura e umidade relativa durante 28 dias conforme Tabela 05. A Figura 02 ilustra o modo de armazenamento para maturação dos salames.

Durante o tempo de maturação foram coletadas amostras para análises físico químicas e microbiológicas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 e realizadas análises de pH, aw, perda de peso, redução de diâmetro, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes (fecais), *Salmonella* spp. e viabilidade dos micro-organismos (*E.faecium* e *L. helveticus*). No final do processamento, foram realizadas composição centesimal e microscopia do embutido fermentado.

Tabela 05: Parâmetros de maturação dos salames

TEMPO (dias)	TEMPERATURA (° C)	UMIDADE RELATIVA (%)
1 -2	20	90
3 - 4	20	85
5 - 9	20	80
10 – 28	20	75

Figura 02: Salames na câmara de maturação



4.2.5 Análises físico-químicas

As amostras para análises físico químicas foram trituradas e homogeneizadas, e em seguida retiradas quantidades necessárias para realização das seguintes análises em triplicata: composição centesimal (proteína, gordura, umidade e cinzas), pH, atividade de água, perda de peso e redução de diâmetro conforme as metodologias descritas abaixo:

- Umidade: secagem em estufa a 105°C até peso constante, e os resultados expressos em (%)g/100g de amostra (CUNNIFF, 1997).
- Proteína: método de Kjeldahl, onde foi utilizado fator 6,25 para conversão em proteína (CUNNIFF, 1997; CECCHI, 2001).
- Teor de lipídios: método de Bligh-Dyer, baseado na extração de mistura de solventes a frio (CECCHI, 2001). Os resultados foram expressos em (%) g de gordura / 100 g de amostra.
- Cinzas: incineração da amostra em mufla a 550°C e os resultados expressos em (%) g/ 100g de amostra (BRASIL, 1981; CUNNIFF, 1997).
- pH: utilizado pHmetro (BRASIL, 1981)
- Atividade de água: realizada utilizando o aparelho Novasina – Axair/Switzerland – Aw sprint TH-500.
- Perda de peso: determinada pela pesagem do embutido logo após o embutimento, até o final da maturação.

4.2.6 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas conforme a metodologia recomendada por Silva et al. (2010) e de acordo com a legislação vigente para produtos cárneos fermentados (Resolução - RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001), que preconiza o monitoramento dos micro-organismos: *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes (fecais), *Salmonella* spp..

4.2.6.1 Preparo das amostras

No Laboratório de Microbiologia de Alimentos, as amostras foram coletadas em frascos estéreis devidamente identificados. De maneira asséptica, 10g da amostra foram adicionados em 90 mL de água destilada estéril contendo Tween 80 (agente dispersante à 1%). Os frascos foram homogeneizados e constituíram a diluição 10^{-1} . A partir desta, realizaram-se as demais diluições decimais seriadas até 10^{-4} , utilizando o mesmo diluente (água destilada estéril).

4.2.6.2 Enumeração de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva)

Foram inoculados, em duplicata, sobre a superfície do Ágar Baird-Parker (BP - suplementado com solução de gema de ovo e telurito de K) contido nas placas de Petri, 0,1 mL de cada diluição. O inóculo foi cuidadosamente espalhado, com auxílio da alça de Drigalsky, por toda à superfície do meio até sua total absorção. Posteriormente as placas de Petri foram incubadas a 35°C por 24/48 horas. Calcularam-se, de acordo com as diluições, as UFC, que se apresentaram negras, brilhantes, convexas e rodeadas por

zonas claras de 2 a 5 mm de diâmetro. Pelo método de Gram, realizou-se a confirmação do resultado por meio de esfregaços em lâminas de microscopia coradas (para a verificação microscópica da morfologia das bactérias) e também foi realizado o teste confirmativo de coagulase.

No teste da coagulase, transferiu-se uma alçada da colônia obtida do PCA para um tubo estéril contendo 0,5 mL de plasma de coelho com EDTA. Os tubos foram incubados em banho maria a 37°C e observados de 30 em 30 minutos nas primeiras 6 horas, os tubos que apresentaram coágulo, foram considerados positivos (SILVA et al, 2010).

4.2.6.3 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais (35° C)

Para a determinação do Número Mais Provável foram inoculadas três séries de três tubos contendo cada uma 9 mL de Caldo Lauril Triptose (CLT) mais 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Cada tubo foi homogeneizado e incubado a 35°C/48 horas. Para o cálculo do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais, foi utilizada a tabela de Hoskins (tabela padrão para diagnóstico da presença de coliformes a 35 e à 45°C em alimentos e água).

4.2.6.4 Determinação do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes (45°C)

Foi empregado o método dos tubos múltiplos, utilizando-se o Caldo EC com incubação a 44,5°C/24 horas. A determinação do NMP de coliformes termotolerantes foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins (conforme descrito no item 4.2.6.3).

4.2.6.5 Pesquisa de *Escherichia coli*

Esta análise foi realizada a partir dos tubos de ensaio contendo Caldo EC usados na quantificação de coliformes termotolerantes e que apresentavam turvação/gás no interior do tubo de Durham. Foi retirada uma alçada de inóculo, o qual foi semeado por esgotamento em placas de Petri, contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (AEAM). Neste meio de cultura, verificou-se positividade para as placas de Petri que apresentaram desenvolvimento de colônias típicas (coloração negra com brilho verde metálico) e atípicas (coloração vinho), sendo necessária a realização dos testes bioquímicos.

Para os testes bioquímicos foi utilizada colônia isolada, semeada em um tubo inclinado contendo Ágar Padrão para Contagem (PCA) e incubada em estufa a 35°C/24 horas. A partir da massa de células crescida neste tubo realizou-se o IMViC, que consiste no teste do Citrato, teste do Indol, teste do Vermelho de Metila e Voges-Proskauer.

Foram confirmadas como *E.coli* todas as culturas que apresentaram indol (+) ou (-), Vermelho de Metila (+), Voges-Proskauer (-) , Citrato (-), e sob coloração de Gram se apresentaram como bastonetes Gram negativos (SILVA et al, 2010).

4.2.6.6 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foram adicionados e homogeneizados 25 g da amostra em 225 mL de Caldo Lactosado (CL) e de água peptonada a 1%. Em seguida, incubou-se a amostra a 35°C por 24 horas. Após este período, 1 mL de cada cultivo foi transferido para os tubos de ensaio, contendo 9 mL de Caldo Selenito Cistina (CSC). Após 24 horas foram

realizadas semeaduras em placas de Petri, contendo Ágar *Salmonella Shigella* (ASS). As colônias com coloração creme com/sem centro negro foram submetidas ao teste sorológico. No teste sorológico, verificou-se positividade para o micro-organismo do gênero *Salmonella*, por meio da formação de coágulo no inóculo após dois minutos de exposição à presença do soro polivalente, onde a ausência de formação do coágulo indica resultado negativo para este micro-organismo.

4.2.6.7 Viabilidade dos micro-organismos probióticos

A avaliação da viabilidade dos micro-organismos potencialmente probióticos presentes nas amostras de salame foi realizada nos dias 0, 7, 14, 28 e 35 dias de fabricação, a partir de diluições decimais seriadas, que consiste na transferência de 10g da amostra de forma asséptica para um frasco de Erlenmeyer estéril contendo 90 mL de água peptonada 0,1%. Esta solução foi agitada vigorosamente e, em seguida, realizada as diluições subsequentes utilizando-se o mesmo diluente e as inoculações feitas por profundidade em meios seletivos para a contagem dos micro-organismos. O resultado foi multiplicado pela recíproca da diluição e valor expresso em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g).

Foram utilizados os seguintes meios seletivos para cada tipo de micro-organismo:

- *Enterococcus faecium*: ágar Brain Heart Infusion (BHI) onde as placas após a inoculação foram incubadas à 37°C/24 horas.
- *Lactobacillus helveticus*: ágar MRS, após a inoculação as placas foram incubadas a 37°C/48 horas.

4.2.7 Microscopia

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada da matéria-prima (carne), do embutido fermentado com *E. faecium* e do embutido fermentado com *Lactobacillus helveticus*, conforme a metodologia proposta por Madi-Ravazzi (2009). As amostras foram selecionadas em pedaços de 0,5 cm², e fixadas em solução de glutaraldeído, e em seguida, foram tratados com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 durante 1 hora e então, foram desidratados em uma série de soluções de acetona de concentrações crescentes 30, 50, 70, 90 e 100 %. Posteriormente, as amostras foram secas no ponto crítico por 1 hora para a remoção total da umidade. Em seguida, foram metalizadas e submetidas à observação em microscópio eletrônico de varredura (Leo 450vpi, análises em 15v) em sala climatizada.

4.2.8 Sobrevivência dos micro-organismos *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* no salame durante a simulação das condições gastrointestinais

Depois de terminado o processo de maturação do salame, os que continham *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* foram testados quanto à sobrevivência nas condições do trato gastrointestinal. Esta simulação foi realizada de acordo com Liserre et al. (2007) com algumas modificações.

As amostras de salames foram trituradas em liquidificador estéril, em seguida foram adicionadas 10 gramas do salame triturado em 90 mL de solução salina 0,5%. Desta diluição foram retiradas 4 alíquotas de 10 mL e adicionadas em tubos estéreis.

O pH dos tubos foi ajustado para 2,0-2,5 com solução de ácido clorídrico 0,5N, seguido da adição de solução de pepsina (3g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e lipase de *Aspergillus niger* (0,9 mg/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados

Unidos), em seguida foram incubados a 37°C sob agitação. A contagem dos micro-organismos foi realizada nos tempos 0, 30 e 60 minutos de análise, em meio ágar MRS e BHI, utilizando diluições decimais de água peptonada à 0,1%. As placas foram incubadas a 24/48 horas.

Na etapa seguinte, foi ajustado o valor de pH para 4,3-5,2 com a adição de pancreatina (1 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e sais biliares (10 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), os tubos foram incubados novamente por 120 minutos a 37°C sob agitação. Após 240 minutos da análise foi realizada a contagem dos micro-organismos conforme descrito na etapa anterior.

Na última etapa, foram adicionados aos tubos soluções de pancreatina (1 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e sais biliares (10 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) ajustando o pH para 6,7-7,5, seguida da incubação por 120 minutos a 37°C sob agitação. Após este tempo, foi realizada a contagem no tempo de 360 minutos de análise, como descrito anteriormente.

4.2.9 Análise Sensorial

De acordo com a Resolução CNS 196/96 (BRASIL, 2005), “Toda pesquisa envolvendo seres humanos deverá ser submetida à apreciação de um Comitê de Ética em Pesquisa”, para tanto esta pesquisa foi submetida à avaliação de risco a saúde humana ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP campus de São José do Rio Preto.

Desta forma, os participantes da análise sensorial antes de responderem ao questionário e avaliarem as amostras, receberam um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), com todas as informações referentes à pesquisa, a fim de prestar esclarecimentos sobre a importância de sua participação voluntária (ANEXO).

Foi realizado o teste de aceitação, onde os provadores avaliaram aparência, cor e o aroma de três amostras de salame (salame comercial, salame com *E. faecium* e outro com *L. helveticus*). As três amostras de salame foram avaliadas de forma monádica, aleatorizadas, codificadas com Algarismos de três dígitos em cabines individuais (Figura 03). As amostras foram avaliadas por 100 consumidores (mulheres e homens), e estes foram selecionados de acordo com o interesse e disponibilidade em participar da equipe sensorial.

Foi realizado o Índice de Aceitabilidade (IA) em relação aos atributos aparência, cor e aroma e os provadores avaliaram o quanto gostaram ou desgostaram do produto, utilizando a escala hedônica, estruturada em nove pontos (indo de 9 “gostei extremamente” até 1 “desgostei extremamente”) e também uma pesquisa de intenção de compra dos embutidos, conforme Figura 04.

No cálculo do Índice de Aceitabilidade do produto, foi utilizada a equação:

$$IA(\%) = (A \times 100) / B$$

Onde A é a nota média obtida para o produto e B é a nota máxima dada ao produto. O produto apresentando um índice de aceitabilidade maior ou igual a 70 representa boa aceitação (DUTCOSKY, 2007).

Figura 03: Amostras de salame



Figura 04: Formulário da avaliação sensorial.

Nome: _____ **Idade:** _____ **Sexo** () F () M

Com qual frequência consome salame?

() diariamente () semanalmente () quinzenalmente () mensalmente () não consumo salame.

Consome produtos probióticos? () Sim () Não

Você irá receber três amostras de salame, de forma monádica (uma de cada vez). Por favor, avalie cada item segundo a escala abaixo.

- 1-Desgostei extremamente
- 2-Desgostei muitíssimo
- 3-Desgostei moderadamente
- 4-Desgostei levemente
- 5-nem gostei nem desgostei
- 6-Gostei levemente
- 7-Gostei moderadamente
- 8-Gostei muitíssimo
- 9-Gostei extremamente

Item	Amostra	Amostra	Amostra
Aparência			
Cor			
Aroma			

Assinale, para cada amostra, qual seria sua atitude de compra:

- 1- Eu certamente não compraria esta amostra
- 2-Eu provavelmente não compraria esta amostra
- 3-Tenho dúvidas se compraria esta amostra
- 4-Eu provavelmente compraria esta amostra
- 5-Eu certamente compraria esta amostra

Amostra	Amostra	Amostra

4.2.10 Análise estatística

Foram realizados 3 repetições de cada processamento e os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, aplicando testes de análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (ao nível de 5% de significância). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa computacional Minitab 16 (BOX; HINTER, 1978).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de sensibilidade das bactérias frente aos sais de cura

Erkkila et al. (2001) relatam que adição de probióticos em produtos cárneos, como o salame, vem sendo pesquisada e desenvolvida em virtude do produto não sofrer tratamento térmico, o que não causaria a morte dos micro-organismos probióticos. Entretanto, os micro-organismos devem resistir as substâncias utilizadas na formulação como sal, especiarias, nitrito e nitrato de sódio.

Nesta pesquisa, os resultados médios obtidos para *Enterococcus faecium* nas concentrações de cloreto de sódio foram 9,85 log UFC/mL para o 0%, 9,87 log UFC/mL para 1%, 9,82 log UFC/mL para 2%, 9,73 log UFC/mL para 3% não apresentando diferença estatística ($p>0,05$) entre as concentrações, mostrando capacidade em manter-se viável em produtos cárneos adicionados de sal. Já para o *Lactobacillus helveticus* foram 10,18 log UFC/mL para 0%, 7,58 log UFC/mL para 1%, 4,85 log UFC/mL para 2%, 3,58 log UFC/mL para 3%, apresentando diferença estatística ($p<0,05$) e não apresentou viabilidade satisfatória, sendo que a concentração mínima de células viáveis deve ser de 10^8 a 10^9 UFC/g do produto para obtenção de efeito probiótico.

Na análise de resistência a sais de cura, ambas as bactérias apresentaram boa viabilidade, 9,76 log UFC/mL (*E. faecium*) e 9,36 log UFC/mL (*L. helveticus*), demonstrando que possivelmente sais de cura não vão interferir na sua manutenção em produtos embutidos.

As Figuras 05 e 06 mostram os resultados obtidos do teste de resistência das bactérias *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* frente aos sais de cura (0,1%) e ao cloreto de sódio (0, 1, 2 e 3 %)

Figura 05: Resistências das bactérias frente aos sais de cura.

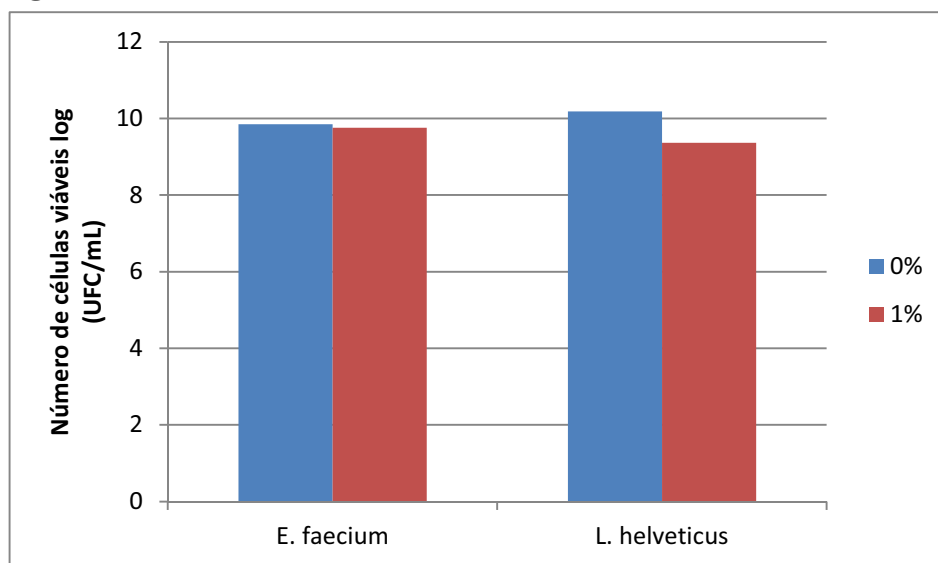
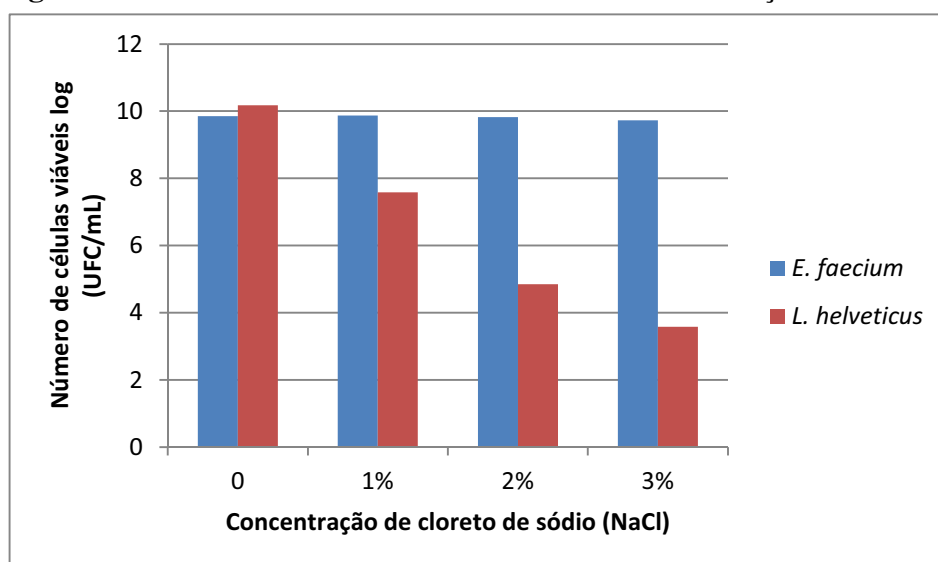


Figura 06: Teste das bactérias frente a diferentes concentrações de NaCl



Resultados semelhantes foram encontrados por Schossler (2009) quando testou a resistência da bactéria probiótica *Bifidobacterium lactis* frente as concentrações de 1, 1,5 e 2% de cloreto de sódio e de 150, 200 e 250 ppm de nitrato de sódio, e obteve valores mínimos de 9 log UFC/g, podendo esta ser adicionada em produtos cárneos. Macedo et al. (2005) testaram a resistência das cultura probióticas *Lactobacillus rhamosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* frente a concentrações de

cloreto de sódio (0 a 3%) e de nitrato de sódio (0 a 200ppm), onde os resultados obtidos mostraram que as bactérias apresentaram boa viabilidade, com contagens superiores ao recomendado para um efeito probiótico.

5.2 Testes de simulação de condições de estresse

5.2.1 Resistência à acidez

A sobrevivência das culturas *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* foram avaliadas através de testes de exposição a condições ácidas. As Figuras 07 e 08 representam a viabilidade da cultura nos diferentes valores de pH (3,0, 4,0 e 5,0) e tempo.

A concentração inicial da bactéria *Enterococcus faecium* foi de 10,3 log UFC/mL e após 4 horas de exposição foram encontrados valores médios de 3,4 log UFC/ mL em pH 3,0, de 9,8 log UFC/ mL em pH 4,0 e 10,6 log UFC/ mL em pH 5,0. Apresentando diferença estatística entre os tempos avaliados em cada pH. Enquanto que a *Lactobacillus helveticus* apresentou concentração inicial de 10,8 log UFC/mL e após 4 horas de exposição 10,2 log UFC/ mL em pH 5,0, 10,0 log UFC/ mL em pH 4,0 e 7,1 log UFC/ mL em pH 3,0, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempo do pH 3 e 5.

Figura 07: *Enterococcus faecium* frente à condições ácidas

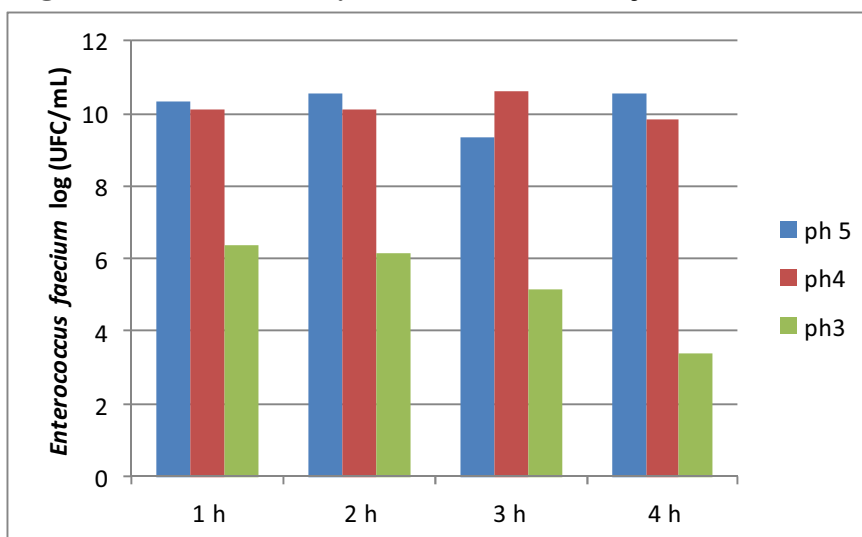
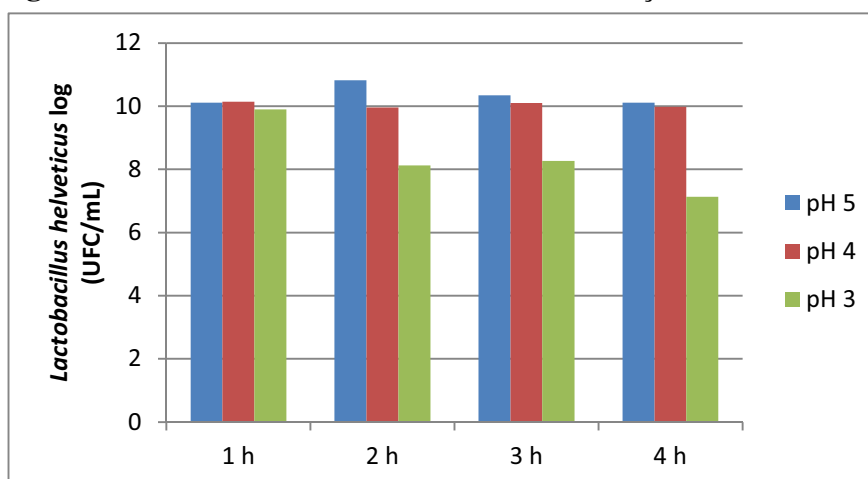


Figura 08: *Lactobacillus helveticus* frente à condições ácidas



Macedo (2005), avaliando a capacidade de resistência a ácido de *Lactobacillus paracasei*, obteve valores iniciais de pH 3.0; 4.0 e 5.0 de $1,0 \times 10^9$, $7,5 \times 10^8$, $1,0 \times 10^9$ UFC/ML, respectivamente, e após 4 horas de exposição $1,2 \times 10^9$ UFC/ mL em pH 3,0, $1,5 \times 10^9$ UFC/ mL em pH 4,0 e $2,7 \times 10^9$ UFC/ mL em pH 5,0, demonstrando que a viabilidade das culturas não foi afetado pelo baixo pH. Klaenhammer (1993) cita que os níveis de tolerância a diferentes valores de pH podem variar entre as bactérias probióticas.

Em pesquisa realizada por Redondo (2008) com teste de resistência à ácido das culturas de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416, demonstrou que ambos os micro-organismos resistiram aos diferentes pH, indicando capacidade de crescimento, porém *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 apresentou maior resistência.

Essa maior resistência a condições ácidas pela bactéria *Lactobacillus helveticus*, pode ser explicada pelo fato que alguns micro-organismos apresentam um citoplasma tamponante (pH 3,72 a 7,74) favorecendo a resistência e estabilidade em condições ácidas (RIUS et al., 1994).

Santa (2008) testou 45 cepas de bactérias lácticas em relação à acidez, e encontrou 51% que aumentaram sua concentração quando mantidas em pH 3,0 por 3 horas à 37°C, sendo que o maior aumento ficou em torno de 1,3 log UFC/ mL.

A acidez é o fator de maior importância sobre a viabilidade e multiplicação das bactérias, onde a maioria destas apresentam desenvolvimento reduzido em valores de pH inferiores a 4,5. Este fato está relacionado pela forma não dissociada do ácido láctico que penetra através da membrana celular e provoca colapso no gradiente de concentração, causando efeito bactericida (AMMOR; MAYO, 2007), o que possivelmente pode ter ocorrido com o *E. faecium*.

Tyoppnen et al. (2003b) relata que produtos como carne e leite, apresentam capacidade tamponante em ambientes ácidos, assim protegendo os micro-organismos probióticos de substâncias inibidoras.

5.2.2 Resistência aos sais biliares

A concentração inicial de *Enterococcus faecium* foi de 10,1 log UFC/ mL, após 4 horas de exposição à 0, 0,15 e 0,30% de sais biliares foram encontrados valores de

11,2 log UFC/ mL, 10,9 log UFC/ mL e 10,5 log UFC/ mL, respectivamente. Os resultados não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre os tempos das concentrações de sais biliares.

Para o *Lactobacillus helveticus* a contagem inicial foi de 10,8 log UFC/mL, e após 4 horas de exposição aos sais biliares, foram encontrados 11,2 log UFC/mL para 0%, 10,0 log UFC/mL para 0,15% e 9,9 log UFC/mL para 0,30% de sais biliares. Os resultados apresentaram diferença estatística ($p<0,05$) entre dos tempos do controle e 0,15 % de sais biliares.

O efeito da exposição das bactérias *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* as diferentes concentrações de sais biliares durante o período de 4 horas está apresentado nas Figuras 09 e 10.

Figura 09: *E. faecium* frente diferentes concentrações de sais biliares

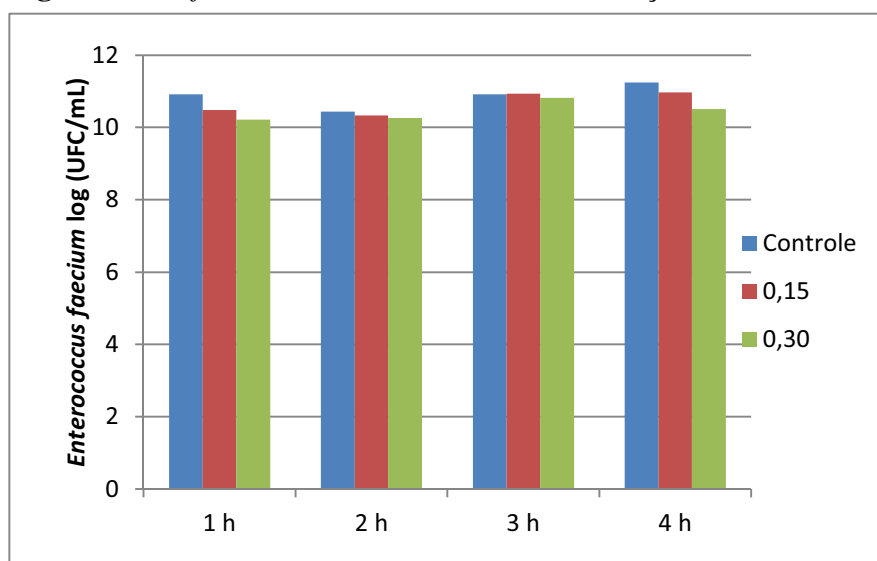
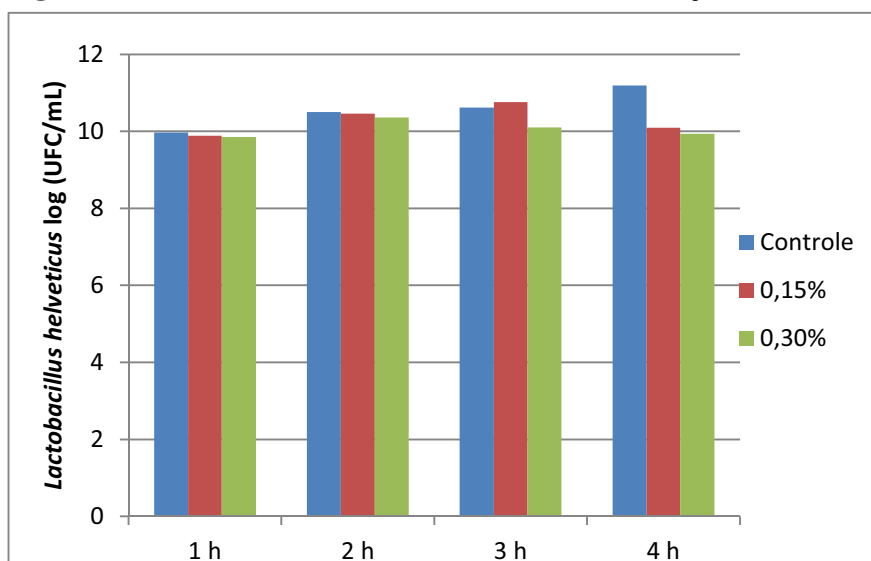


Figura 10: *L. helveticus* frente a diferentes concentrações de sais biliares.



Os sais biliares são lançados no início do intestino delgado após a ingestão de alimentos gordurosos, emulsionando as gorduras e facilitando a digestão. Porém, a membrana celular dos micro-organismos também é constituída por lipídios e ácidos graxos, podendo assim a presença de sais biliares inibir a ação dos mesmos (PENNACCHIA et al., 2004).

Entretanto, verificou-se que as bactérias *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* não foram afetadas pela presença de sais biliares, mesmo após 4 horas de exposição, a concentração final manteve-se próxima da concentração inicial.

Macedo (2005) testou a sensibilidade da cepa de *Lactobacillus paracasei* frente aos sais biliares, a qual apresentou aumento no número de células a partir de 2,5 horas de exposição.

Erkkila e Petaja (2000) citam que o durante o processamento de embutidos, os micro-organismos adicionados à massa são envolvidos pela matriz cárnea composta de carne e gordura, e que devido a essa proteção a sobrevivência dos micro-organismos

durante a passagem no trato gastrointestinal mostra-se maior do que a verificada pela exposição isolada dos micro-organismos à acidez e sais biliares.

5.3 Teste de sensibilidade das bactérias aos antimicrobianos

Dentre alguns critérios para a seleção de probióticos para aplicação em alimentos, incluem a resistência a antibióticos (FAO, 2002). As cepas de *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* foram testadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos. Os resultados encontram-se na Tabela 06.

Tabela 06: Resistências dos micro-organismos aos antibióticos

Antibióticos	<i>E. faecium</i> (mm)	<i>L. helveticus</i> (mm)
Cloranfenicol	24 (S*)	0
Cefoxitina	20	0
Azitromicina	15	0
Ciprofloxacina	17 (I*)	0
Amoxicilina	38	0
Tetraciclina	30 (S*)	51
Nitrofurantoína	22 (S*)	52
Linezolida	25 (S*)	0
Eritromicina	19 (I*)	0
Estreptomicina	17	35
Penicilina	33 (S*)	0
Oxacilina	15	40
Clindamicina	26	0
Vancomicina	20 (S*)	44
Norfloxacina	17 (S*)	0
Levofloxacina	16 (I*)	0
Amicacina	21	14
Gentamicina	17	21
Ampicilina	33	0

*De acordo com TSLI (2012) gênero *Enterococcus* spp.

Determinar a viabilidade dos micro-organismos frente aos antibióticos é de grande importância em virtude de que alguns consumidores destes produtos podem estar fazendo o uso de algum medicamento, sendo necessária a viabilidade do micro-

organismo, para que este possa fazer efeito ao organismo (TODOROV et al., 2011). Entretanto, a resistência a antibióticos é um problema, pois pode ser transferida a outros micro-organismos.

As cepas probióticas como outras também utilizadas em alimentos precisam ser testadas quanto à resistência natural aos antibióticos, para prevenir transferência de resistências indesejáveis a outras bactérias endógenas. Os genes de resistência a antibióticos, especialmente codificados por plasmídios, podem ser transferidos entre micro-organismos (FAO, 2001).

Diante do exposto, maior atenção tem sido dada aos alimentos como potencial transportador de genes de resistência à antibióticos, devido ao fato que a utilização de culturas *starters* em alimentos fermentados podem servir como reservatório dos genes, aumentando a chance de transferir a outras bactérias (KASTNER et al., 2006).

Ljung & Wadstrom (2006) citam que o uso de *Enterococcus* spp. como probiótico tem sido questionada em virtude da sua capacidade de transferência de genes que conferem resistência à antibióticos a outras bactérias patogênicas dificultando a cura de doenças. Uma das propriedades indesejáveis é a presença de genes transmissíveis que codificam para a resistência a quimioterápicos, principalmente aos glicopeptídios, como a vancomicina.

Resultados semelhantes ao encontrado nesta pesquisa quanto à vancomicina foram obtidos por Temmerman et al. (2003) encontrou cepas *E. faecium* em 6 suplementos alimentares e todas foram sensíveis à vancomicina. Peters et al. (2003) avaliando cepas de enterococos de alimentos de origem animal, verificaram que 100% delas foram sensíveis aos antibióticos ampicilina e vancomicina. Renye et al (2009) avaliando 33 cepas de enterococos isolados de queijo encontraram todas com sensibilidade a vancomicina.

Em pesquisa de Schittler (2012) que avaliou 16 cepas de *E. faecium* isoladas de leite, encontrou 94% com sensibilidade a ampicilina, 81% a tetraciclina e 100% a vancomicina.

De acordo com Bernadeau et al. (2008), o gênero *Lactobacillus* spp. apresenta resistência natural aos seguintes antibióticos: bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, ácido fusídrico, Kanamicina, gentamicina, metronidazol, nitrofurantoína, norfloxacina, estreptomicina, sulfadiazina, teicoplanina, trimetoprin, sulfametoxazol e vancomicina. Apesar de algumas cepas de bactérias lácticas, principalmente as de *Lactobacillus* spp., apresentarem resistência a determinados antibióticos, ela não é codificada por plasmídeos, não sendo transmitidas a outras bactérias (SAARELA, 2000).

5.4 Processamento de salame

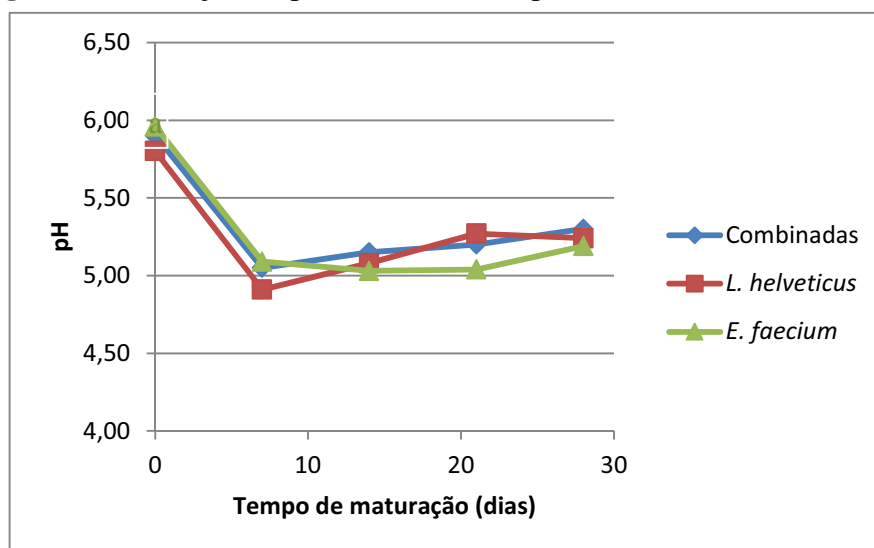
5.4.1 Análises Físico-químicas

Durante o tempo de maturação, que constou da fermentação e secagem totalizando 28 dias, foram realizadas as seguintes análises físico-químicas: pH, atividade de água, perda de peso e redução do diâmetro. No final do processo de maturação foi verificada a composição centesimal do salame.

5.4.1.1 Determinação do pH

As alterações nos valores de pH durante a maturação dos embutidos fermentados, processados com *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus helveticus* e com os dois micro-organismos juntos estão representados na Figura 11.

Figura 11: Variação do pH dos embutidos processados.



A avaliação do pH de produtos cárneos é de extrema importância para formação das características organolépticas e manutenção da segurança microbiana do produto final (TERRA, 1997).

Observou-se valores iniciais médios de pH 5,9 na carne (matéria-prima) utilizada para o processamento de salame. Segundo Ordóñez et al. (2005) e Andrade (2006) os valores de pH normais para produtos cárneos não devem ultrapassar entre 5,8-6,0. Valores fora dessa faixa de pH podem indicar produto inapto para o consumo, ou seja, podem ser indicadores de deteriorações química e/ou microbiana.

No sétimo dia de maturação em todos os processamentos ocorreu uma diminuição nos valores médios de pH, essa queda está relacionada com a adição das culturas *starters* que fermentam as fontes de carboidratos liberando ácido láctico (Ordóñez et al., 1998). Lucke (2000) destaca que a queda do pH inibe a ação de bactérias indesejáveis, mantendo a segurança microbiológica do produto.

Em pesquisa realizada por Macedo et al. (2008) utilizando culturas probióticas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* no

processamento de embutido fermentado, estas apresentaram menores valores de pH quando comparados com o processamento com a utilização apenas da cultura *starter*, com valores iniciais de 5,0 e com finais de 4,5.

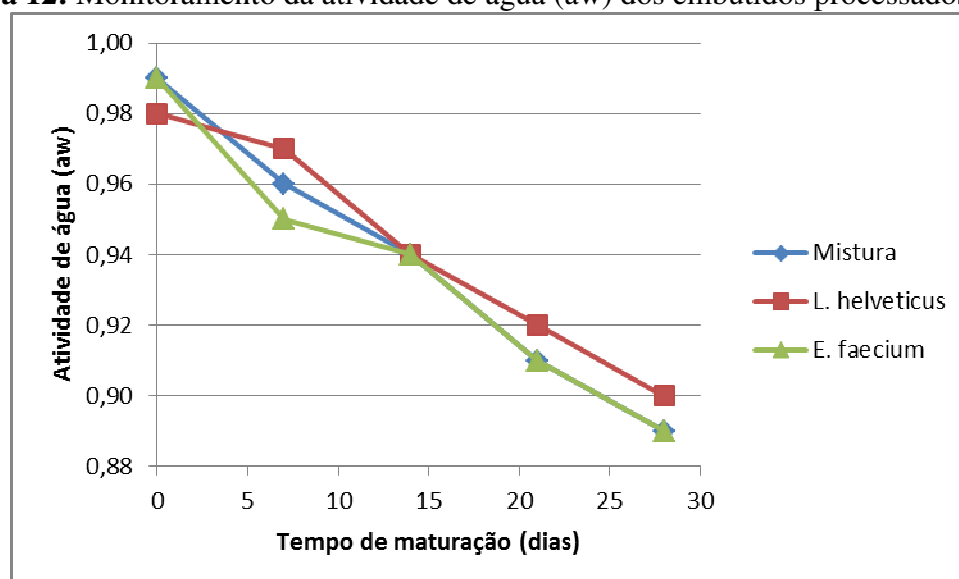
Dentre os fatores que estão relacionados com essas diferenças entre valores de pH final destacam-se a capacidade de acidificação da cultura *starter* adicionada (SANTA, 2008) e adição de diferentes açúcares (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, et al. 2003).

5.4.1.2 Determinação da atividade de água

A Figura 12 está representando os valores de atividade de água (A_w) encontradas no experimento durante os 28 dias de maturação dos embutidos, coletando amostras a cada 7 dias.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame (BRASIL, 2000) preconiza valor máximo de 0,90 para o produto final, e os valores encontrados nesse trabalho alcançaram esse limite após o vigésimo primeiro dia de maturação.

Figura 12: Monitoramento da atividade de água (a_w) dos embutidos processados.



Durante a maturação os embutidos apresentaram uma redução gradual da atividade de água, apresentando diferença estatística no nível de 5% entre os tempos de maturação, entretanto, não apresentaram diferença estatística no tempo de 28 dias entre os tratamentos.

O que foi um bom indicador, uma vez que, a atividade de água é um dos parâmetros mais importantes na estabilidade dos alimentos, e a carne *in natura* apresenta alta atividade de água, sendo susceptível a deterioração microbiana e consequentemente uma menor vida de prateleira.

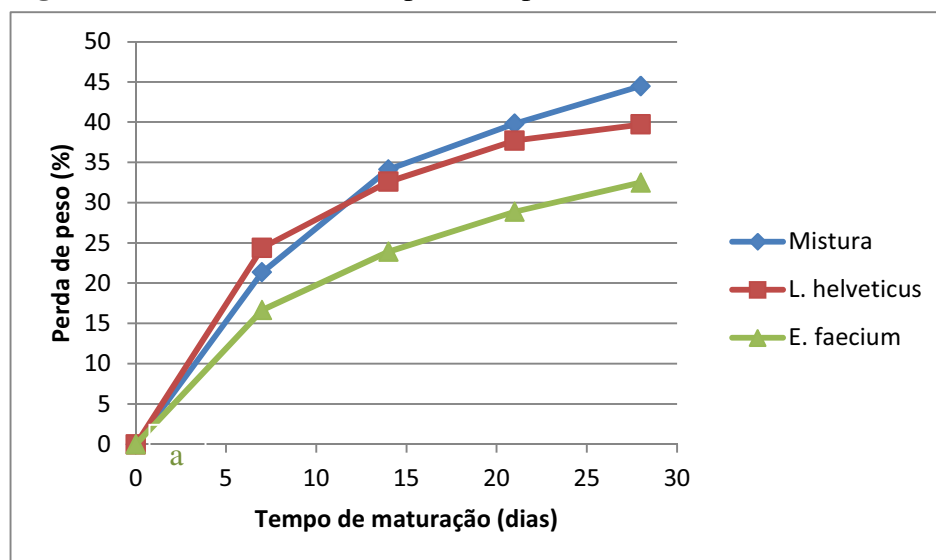
De acordo com a legislação brasileira embutidos fermentados com valores de atividade de água iguais ou inferiores a 0,90 indicam o término do processamento e estabilidade do produto, porém valores de atividade de água abaixo podem gerar problemas na textura dos embutidos (TERRA;FRIES; TERRA, 2004).

Mauriello; Casaburi e Villani (2004) relatam que a queda da atividade de água está relacionada com a diminuição do pH, sendo que quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas da carne (ao redor 5,1) ocorre a diminuição da capacidade de retenção de água (CRA) facilitando a desidratação do produto, o que também foi observado nesta pesquisa (Figura 12).

5.4.1.3 Determinação da perda de peso

A redução do peso dos embutidos é consequência natural do processamento durante a etapa secagem. A perda de peso ocorrida durante o período de maturação está representada na Figura 13.

Figura 13: Monitoramento da perda de peso dos embutidos fermentados



Na figura 13 pode-se perceber que as perdas de peso médias dos salames no final do processamento foram 32,5% para a formulação contendo *Enterococcus faecium*, 39,7% para o processamento contendo *Lactobacillus helveticus* e 44,5% para a formulação contendo a combinação das bactérias, apresentando diferença estatística no nível de 5% entre os tempos de maturação e entre os tratamentos no tempo final (28 dias).

Coelho et. al (2000) relataram que os embutidos podem perder até 40% de seu peso durante o processamento, maiores perdas podem interferir na textura, deixando o produto com deformações. Pode-se observar que na formulação onde estavam presentes os 2 micro-organismos este parâmetro atingiu valores médios de 44,5% e com isto foi possível notar a deformação. Na figura 14 pode-se observar embutidos com e sem deformação. A deformação pode ter ocorrido devido a localização das peças do embutido dentro da estufa de maturação.

Figura 14: Embutidos no final da maturação.



Em pesquisa de Garcia; Gagleazzi e Sobral (2000) com processamento de salame tipo italiano foi obtido perda de peso de 44% com 20 dias de maturação. Campos (2002) no processamento de salame tipo italiano também teve perda de peso entre 37,9 e 40,7%. Já Macedo (2005) em processamento de salame com culturas probióticas obteve valores entre 30,46% e 38,18%. No trabalho de Santa (2008) obteve-se valores médios de perda de peso entre 37,60% e 38,02%. Valores estes semelhantes ao encontrado nessa pesquisa, ou seja a redução de peso depende de fatores como pH, diâmetro e condições da câmara de maturação.

5.4.1.4 Composição centesimal

Na Tabela 7 estão apresentadas as características físico-químicas dos salames no final do processamento (28º dia). A legislação apresenta Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do salame, que estabelece parâmetros mínimo e máximo de qualidade que o produto deve apresentar (BRASIL, 2000).

Tabela 07: Composição centesimal dos embutidos

	Nutrientes (%)			
	Combinação	<i>E.faecium</i>	<i>L. helveticus</i>	Padrão(BRASIL,2000)
Umidade	36,10 ^a ±0,12	37,16 ^b ± 0,28	37,20 ^b ± 0,32	Max. 40%
Proteína	30,67 ^a ±0,35	32,97 ^b ± 0,32	32,83 ^b ±0,28	Mín. 20%
Lipídios	29,65 ^a ±0,28	27,20 ^b ± 0,15	27,87 ^c ± 0,12	Máx. 35%
Cinzas	2,80 ^a ±0,15	3,07 ^b ± 0,21	3,13 ^b ± 0,19	----

*Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si no teste de Tukey ao nível de 5%.

Na tabela 07 pode-se observar que os valores de umidade do produtos processados apresentam-se dentro dos padrões permitidos pela legislação onde o máximo é de 40%, e os valores obtidos variaram de 36 a 37%. Garcia; Gagleazzi e Sobral (2000) em processamento de salame tipo italiano obtiveram 36% de umidade após 20 dias de maturação, e Macedo (2005) que utilizou no processamento de salames adicionados de cepas de probióticos obteve umidade de 38,54 e 41,48% após 25 dias maturação, ou seja, valores muito semelhantes aos obtidos neste estudo.

Isto é importante, pois a umidade do produto é um dos fatores que devem ser controlados a fim de obter e manter o produto com suas características organolépticas durante a vida de prateleira. Jay (2005) explica que quanto maior a umidade, maior a quantidade de água livre no produto, e esta é a utilizada nas reações bioquímicas para o crescimento e multiplicação de microrganismos indesejáveis. Em contrapartida, a umidade é responsável pelas características sensoriais, sendo que as reações de lipólise e proteólise requerem meio aquoso para ocorrer, tendo influencia na cor, textura e firmeza do produto (ORDOÑEZ et al. 1998).

Em relação ao teor de proteínas os resultados obtidos estão dentro dos padrões da legislação para todos os processamentos. As proteínas da carne apresentam um alto

valor biológico, determinado pelo seu conteúdo em aminoácidos essenciais (ANDRADE, 2006). São responsáveis pelas características funcionais das carnes, que determinam o rendimento, qualidade, estrutura e atributos sensoriais dos produtos cárneos (SHIMOKOMAKI et al., 2006).

Terra, Fries e Terra (2004) em pesquisa com processamento de salame tipo italiano encontrou valores médios de proteína entre 38,7 a 49%. Em outro trabalho Macedo (2005) processou embutido com culturas probióticas encontrou valores médios 21,81 a 24,78% após 28 dias de maturação, próximos aos valores encontrados nesta pesquisa após 28 dias de maturação com 30,67; 32,83 e 32,97% de proteína.

Para o teor de lipídeos, a legislação preconiza no máximo 35%, os valores médios obtidos em ambos os processamentos 29,65, 27,20 e 27,87% estão dentro do permitido. Os lipídios contribuem para o sabor, textura e aparência dos produtos, e sob o ponto de vista fisiológico, são fonte de vitaminas, ácidos graxos essenciais e de energia (TERRA, 1998).

Terra, Fries e Terra (2004) encontraram valores inferiores a 20%, afirmando ser interessante do ponto de vista tecnológico e nutricional, pois além de ser considerado um produto *light*, com baixo teor de gordura, não interferiu no flavor e na textura do produto final. Já Santa (2008) processou salame com cultura de *Lactobacillus plantarum* e foram encontrados valores médios entre 31,68 e 34,83%.

5.4.2 Análises microbiológicas

Na Tabela 08 estão representados os resultados das análises microbiológicas durante o período de maturação (28 dias), para os processamentos com *Enterococcus*

faecium, *Lactobacillus helveticus* e com a combinação das bactérias, também os valores que a legislação preconiza para este tipo de produto.

Tabela 08: Resultados das análises microbiológicas durante 28 dias.

Tempo de maturação	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC / g)	Coliformes totais (NMP / g)	Coliformes termotolerantes (NMP / g)	<i>Escherichia coli</i> (- / +)	<i>Salmonella</i> spp. (- / +)
Combinação					
0	<100	150	4	(+)	(-)
7	<100	75	4	(-)	(-)
14	<100	<3	<3	(-)	(-)
21	<100	<3	<3	(-)	(-)
28	<100	<3	<3	(-)	(-)
<i>L. helveticus</i>					
0	<100	75	4	(+)	(-)
7	<100	9	4	(-)	(-)
14	<100	<3	<3	(-)	(-)
21	<100	<3	<3	(-)	(-)
28	<100	<3	<3	(-)	(-)
<i>E. faecium</i>					
0	<100	150	75	(+)	(-)
7	<100	9	9	(-)	(-)
14	<100	< 3	< 3	(-)	(-)
21	<100	< 3	< 3	(-)	(-)
28	<100	< 3	< 3	(-)	(-)
Padrão Federal (BRASIL, 2001)	Máximo 5 x 10³		Máximo 5 x 10³		Ausência em 25 g

O *Staphylococcus* coagulase positivo em alimentos é um indicador de contaminação a partir de pele, boca e das fossas nasais de manipuladores, e também da insatisfatória limpeza e sanitização de equipamentos (SIQUEIRA, 2004).

Nas análises realizadas durante os processamentos, foram encontradas colônias típicas do gênero *Staphylococcus* até o 14º dia, com contagens de $4,4 \times 10^2$ e $1,8 \times 10^3$ UFC/g, entretanto resultou em resultado negativo, segundo o teste coagulase. Esses resultados podem estar relacionados, com obtenção da matéria-prima de maneira

higiênica insatisfatória e influência das culturas *starter* sobre os micro-organismos contaminantes.

Campagnol et al. (2007) em pesquisa com processamento de salame com adição de cultura *Lactobacillus plantarum*, encontraram resultados semelhantes a esta pesquisa quanto a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, e as espécies do gênero *Staphylococcus* apresentaram queda na viabilidade no final da maturação.

Jay (2005) ressalta que valores de pH inferiores a 5,3 e a elevada concentração de culturas *starters* influenciam na inibição do *Staphylococcus* coagulase positiva, pois são considerados maus competidores (LOIR; BARON; GAUTIR, 2003) e seu pH ótimo para desenvolvimento é entre 7,0 -7,5. Como o ocorrido neste trabalho, onde o pH dos processamentos finalizou ao redor de 5,3, assim possivelmente as *starters* adicionadas influenciaram o desenvolvimento *Staphylococcus* coagulase positiva.

Santa (2008) avaliou 50 amostras de salames comerciais sem a presença de cultura *starter* (artesanal), e foi confirmada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em 30% das amostras, e destas 11% apresentaram valores acima do permitido pela legislação. Diferente desta pesquisa, que não encontrou *Staphylococcus* coagulase positiva.

A presença de Coliformes totais é indicador de condições higiênicas insatisfatórias. Normalmente sua concentração diminui com a maturação do salame (MORETTI et al., 2004). Tal comportamento pode ser observado nos processamentos realizados com as culturas potencialmente probióticas *E. faecium*. e *L. helveticus* que apresentaram baixas concentrações de coliformes totais e termotolerantes, estando dentro dos padrões estabelecidos pela legislação. Observou-se queda durante o período de maturação, fato que pode estar relacionado com a presença das culturas *starters*, que

acidificam o meio (baixando pH), sendo um fator inibitório ao desenvolvimento de micro-organismos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Terra; Fries; Terra (2004) que processando salames com e sem cultura *starter*, obtiveram inibição de coliformes após 7º dia de maturação nas amostras com cultura.

Em relação à determinação de *Salmonella* spp., todas as amostras analisadas apresentaram ausência em 25 gramas, estando em acordo com o preconizado pela legislação. Resultados foram semelhantes encontrados por Santa (2008) e Ruiz (2011) avaliando salames com adição de cultura *starter* onde todas as amostras apresentaram ausência, enquanto que Hoffmann et al. (1997) avaliando amostras de salames comerciais, encontraram 13,3% das amostras com presença de *Salmonella* spp.

As culturas *starters* adicionadas em embutido fermentado apresentam a função de inibir micro-organismos patógenos aumentando a vida de prateleira, e são denominadas protetoras. Porém, tem se utilizado culturas probióticas como protetoras, sendo chamadas de *starters* funcionais, pois além de contribuir para qualidade microbiológica ajudam na promoção da saúde (LEROY, VERLUYTEN; VUYST, 2006) como no caso desta pesquisa as culturas potencialmente probióticas possivelmente influenciaram na inibição dos patógenos.

A maioria das pesquisas relacionadas com probióticos em produtos cárneos está concentrada na inibição dos patógenos, consequentemente aumento a segurança microbiológica do produto (MACEDO, PFLANZER, GOMES, 2011). Dentre as pesquisas, MUTHUKUMARASAY, HOLLEY (2006) adicionaram *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 em salame e constataram a inibição de *Escherichia coli* O157:H7. SAMESHIMA et al. (1998) observaram a inibição do crescimento e produção de toxina por *Staphylococcus aureus* em embutido

cárneo com adição de *Lactobacillus rhamnosus* FERM P-15120, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* FERM P-15121 e cultura *Lactobacillus sakei*.

5.4.3 Viabilidade dos micro-organismos

Durante o período de maturação dos embutidos foi realizado o monitoramento da concentração das culturas *starters* adicionadas, para verificar se os valores mantinham-se na concentração de 10^8 a 10^9 UFC/g do produto para obtenção dos efeitos fisiológicos relacionados ao consumo de probióticos (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Nas Figuras 15 e 16 pode-se observar a viabilidade das bactérias *starters* adicionadas no processamento do embutido, sendo a formulação 1 com *E. faecium* e formulação 2 com *L. helveticus*, onde pode-se observar que os resultados foram melhores quando comparadas ao embutido processado com as duas bactérias combinadas (Tabela 17).

Figura 15: Viabilidade do *L. helveticus* durante período de maturação.

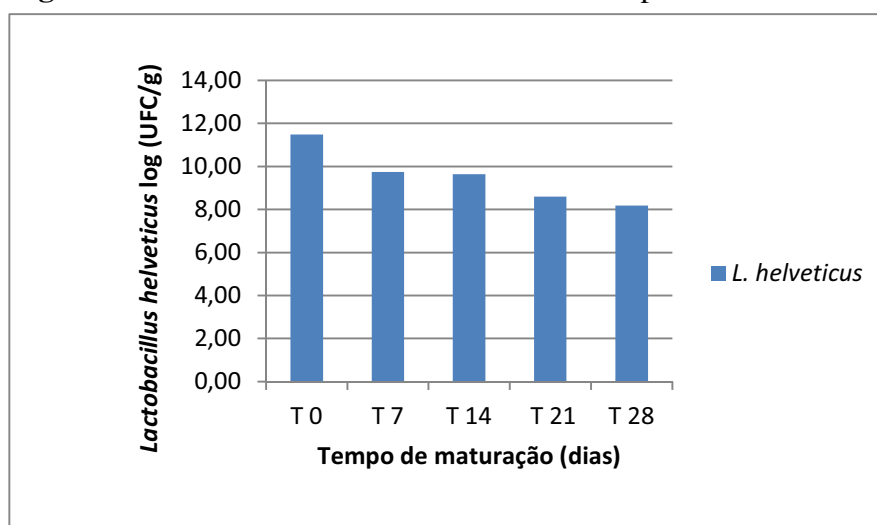
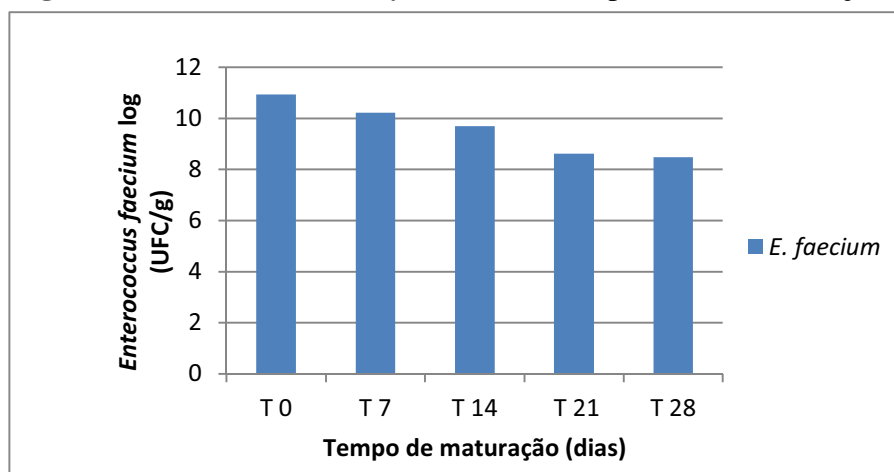


Figura 16: Viabilidade do *E. faecium* durante período de maturação



O processamento com *L. helveticus* apresentou contagem inicial de 11,5 log UFC/g e final de 8,2 log UFC/g, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos avaliados. Para o processamento com *E. faecium* a concentração inicial foi de 10,9 log UFC/g e final de 8,4 log UFC/g, também com diferença estatística ($p < 0,05$) da concentração entre os tempos avaliados. Os valores obtidos nos 2 tratamentos ficaram dentro do recomendado para obtenção dos efeitos benéficos dos probióticos.

Diversas pesquisas tem demonstrado a utilização de bactérias probióticas em embutido fermentado, destas, Arihara et al. (1998) avaliaram a aplicação de *Lactobacillus gasseri*, Macedo et al. (2008) utilizaram culturas probióticas de *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* e Ruiz (2011) trabalharam com adição de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*. Em todos os trabalhos mencionados a viabilidade dos micro-organismos estavam dentro do exigido pela legislação.

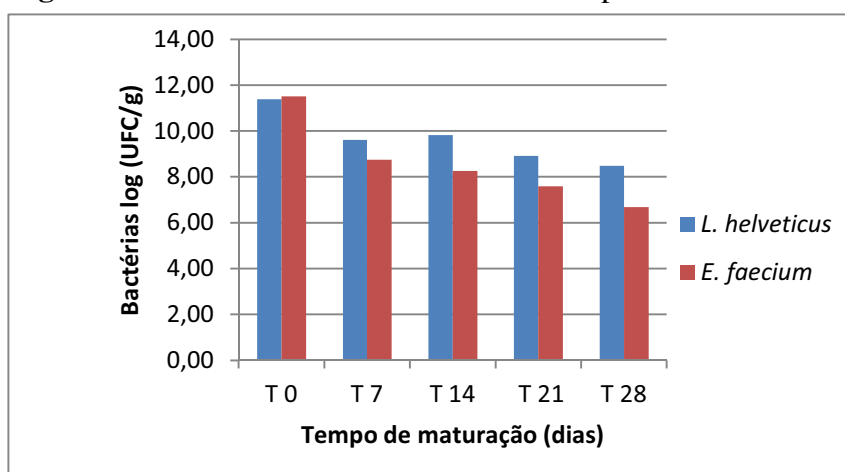
O desenvolvimento das bactérias durante a maturação pode ser influenciado por condições de processamento, tempo, temperatura, umidade relativa (Sanz et al., 1997) quantidade e tipo de açúcar utilizado (González-Fernández et al., 2003), e a quantidade

de sal (Ibañez et al., 1996), onde todos estes parâmetros foram aplicados e monitorados nesta pesquisa.

Para o estudo da viabilidade das bactérias *E.faecium* e *L. helveticus* no embutido cárneo (Tratamento 3) a concentração inicial foi de 11,5 log UFC/mL (*E.faecium*) e 11,4 log UFC/mL (*L.helveticus*), pode-se observar que apresentaram diferença estatística ($p<0,05$) entre os tempos analisados.

Neste processamento houve uma diminuição da viabilidade de ambas as bactérias, com concentrações finais médias de 8,48 log UFC/g (*L. helveticus*) e 6,68 log UFC/g (*E. faecium*), esta última ficando abaixo da concentração recomendada.

Figura 17: Viabilidade das bactérias durante período de maturação.



Komatsu, Buriti e Saad (2008) citam que uma alternativa para aumentar a viabilidade de um probiótico é a adição de outra espécie probiótica em co-cultura, porém salientam que deve-se verificar a compatibilidade entre as culturas empregadas. O que pode ter ocorrido neste trabalho, onde as bactérias não foram compatíveis influenciando uma a outra na viabilidade.

Em virtude dos resultados obtidos na formulação 3 (*E. faecium* e *L. helveticus*) optou-se por continuar a pesquisa apenas com a formulação 1 e 2, onde as bactérias foram adicionadas separadamente no processamento

5.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura da matéria prima carne antes de adicionar as bactérias *L. helveticus* e *E. faecium*, onde pode-se observar a superfície da carne, com irregularidades, áreas fibrosas típicas da estrutura muscular de carnes e a presença de um biofilme na superfície da carne, provavelmente composto por exsudado de bactérias (Figura 18).

As culturas *starters* adicionadas nos embutidos cárneos permaneceram viáveis até o final do processamento com concentrações de 8,2 log UFC/g para *L. helveticus* e 8,4 log UFC/g para *E. faecium*, conforme demonstrado pela microscopia eletrônica de varredura (Figuras 19 e 20). Nestas figuras, verificou-se a presença de grande quantidade de bactérias na superfície da carne.

Figura 18: Microscopia de varredura da matéria-prima carne

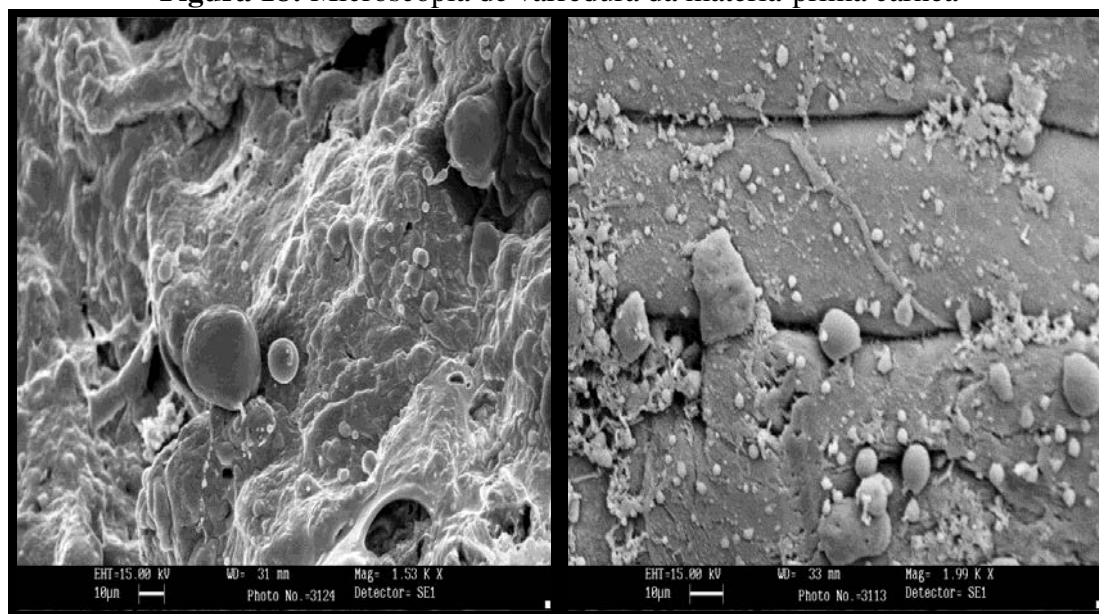


Figura 19:Microscopia eletrônica de varredura do embutido com adição de *L.helveticus*

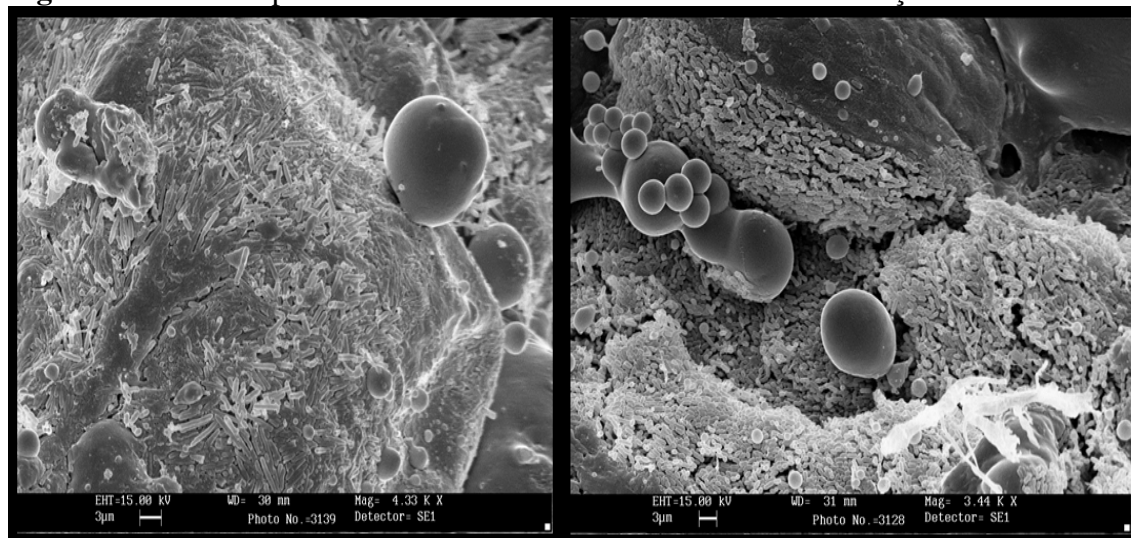
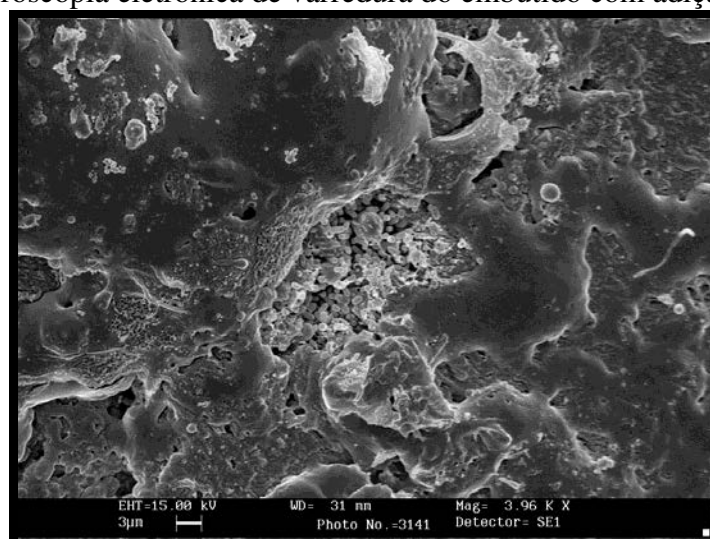


Figura 20: Microscopia eletrônica de varredura do embutido com adição de *E. faecium*



5.4.5 Sobrevivência dos micro-organismos *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* durante a simulação das condições gastrointestinais em salame

As bactérias *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* presentes no produto final com 28 dias de maturação sobreviveram aos 360 minutos da análise, que corresponde ao tempo de passagem pelo trato gastrointestinal de humanos, conforme resultados da Tabela 09.

Tabela 09: Resultados da simulação *in vitro* do trato gastrointestinal

Microrganismos	Tempo 0	30 min.	120 min.	240 min.	360 min.
<i>E. faecium</i>	9,36 ^a	8,28 ^b	7,47 ^c	5,61 ^d	5,50 ^d
<i>L. helveticus</i>	9,75 ^a	8,55 ^b	6,42 ^c	5,76 ^d	4,65 ^e

*Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si no teste de Tukey ao nível de 5%.

Os micro-organismos apresentaram decréscimo na viabilidade durante as fases gástrica (30-120 minutos), entérica I (240 minutos) e entérica II (360 minutos). *Lactobacillus helveticus* apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados, enquanto que o *Enterococcus faecium* não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre as fases entérica I e entérica II.

A sobrevivência dos micro-organismos ao trato gastrointestinal foi relatada em outras pesquisas, como no trabalho de Ji et al. (2013) onde a cepa de *Leuconostoc citreum* sobreviveu com viabilidade final de 2 log UFC/ mL; na pesquisa de Buriti, Castro e Saad (2010) que adicionaram *Lactobacillus acidophilus* em mousse de goiaba simbiótico refrigerado e no mousse congelado, a sobrevivência foi melhor na presença de inulina, ou seja, quando em produto contendo probiótico e adição conjunta de um prebiótico. E na pesquisa de Liserre, Re e Franco (2007) com a cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, esta não resistiu durante a análise, o que não ocorreu quando foi encapsulada com alginato-quitosana apresentando viabilidade final de 10^5 a 10^6 UFC/g.

As bactérias probióticas devem sobreviver ao trato gastrointestinal para exercerem as ações benéficas no organismo. E pesquisas realizadas sobre a sobrevivência de probióticos são de grande importância para seleção e desenvolvimento de novos produtos probióticos, e também para melhorar o entendimento do possível mecanismo envolvendo os efeitos benéficos dos micro-organismos (JERONYMO, 2013).

Algumas alternativas têm sido realizadas para aumentar a sobrevivência dos micro-organismos no TGI, dentre elas seleção de cepas adaptadas as condições de *estress* (pH e bile), tamponamento de iogurte com mistura de proteínas do leite, técnicas de microencapsulação e adição de prebióticos (AKALIN et al., 2007; KAILASAPATHY, 2012).

A microencapsulação tem sido uma das alternativas para manter a viabilidade dos micro-organismos probióticos e assim assegurar as suas propriedades terapêuticas (TRINDADE, 2011). Existem diferentes tipos de material encapsulante, dentre eles, o mais utilizado é o alginato de sódio, proteínas do soro do leite e as gomas (BOSCARIOLI, 2010).

Ruiz (2011) aplicando *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* livre e encapsulado em salame, obteve resultados positivos nas características sensoriais, físico-química e viabilidade em todos os processamentos.

Uma outra alternativa para melhorar a viabilidade dos probióticos é a adição de prebióticos, que são definidos como ingredientes seletivamente fermentáveis que permitem modificações específicas na composição e ou na atividade da microbiota gastrointestinal que resultam em benefícios ao bem estar e à saúde do hospedeiro (ROBERFROID, 2007; WANG, 2009).

5.4.6 Análise sensorial

5.4.6.1 Caracterização do perfil consumidor

Por meio de um breve questionário traçou-se o perfil dos participantes do ensaio sensorial. Nesta avaliação 100 pessoas participaram do teste, que foi formado

principalmente por pessoas na faixa etária de 18-21 anos (38%), seguido pelas faixas etárias 22-25 anos (34%), 26-29 anos (15%), 30-33 anos (4%) e acima de 34 (9%), representado na Figura 21. A avaliação sensorial dos embutidos foi realizada no laboratório de análise sensorial do campus da UNESP de São José do Rio Preto, o que justifica grande parte dos provadores serem jovens. Dentre os participantes, 66% foram de mulheres, conforme Figura 22.

Figura 21: Perfil dos provadores em relação a faixa etária

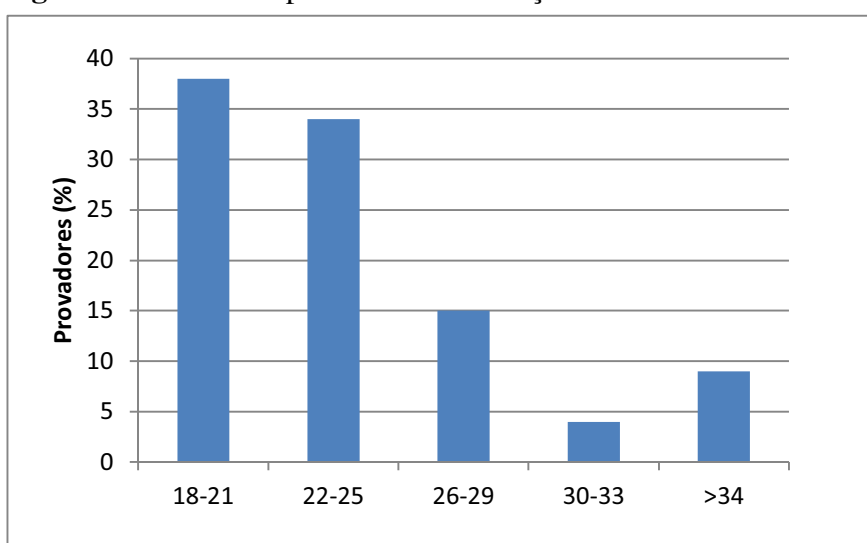
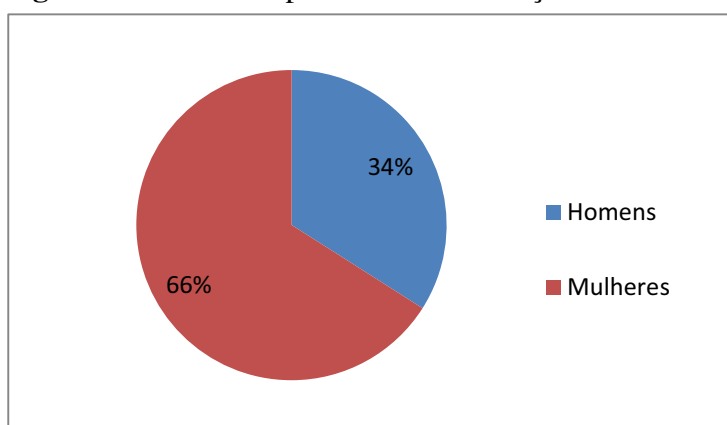


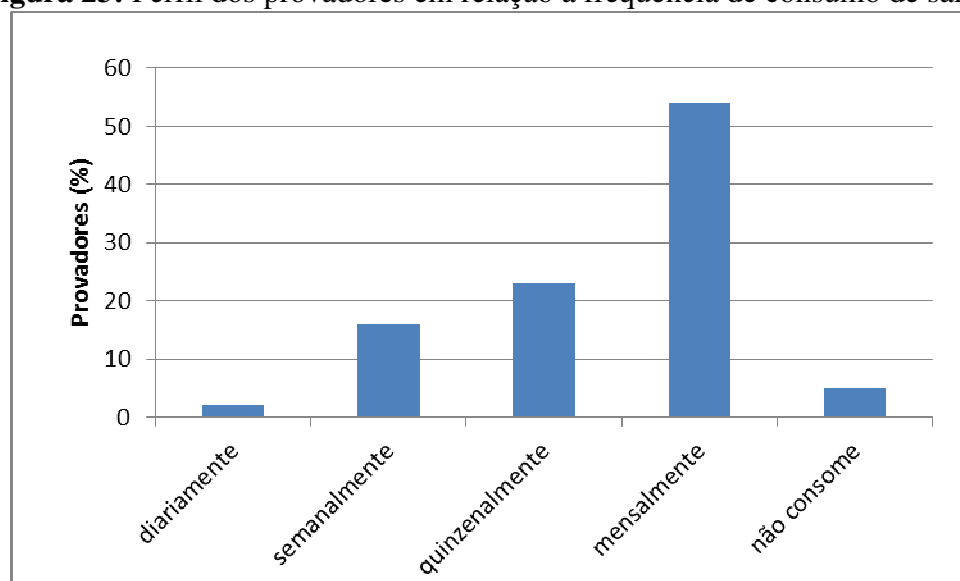
Figura 22: Perfil dos provadores em relação ao sexo.



A maioria dos produtos probióticos encontrados no mercado brasileiro estão voltados para produtos lácteos, portanto, uma das perguntas do questionário foi sobre o consumo de produtos probióticos e 75% dos provadores disseram consumir produtos probióticos, tanto pelas propagandas existentes, e divulgação de suas funcionalidades quanto pelo poder aquisitivo da população.

A frequência de consumo de embutido também foi abordada nesta pesquisa, que apontou que 54% dos provadores consomem mensalmente. O fato do salame não ter uma alta frequência de consumo pode estar relacionado tanto ao preço, quanto que este tipo de produto no Brasil apresenta maior consumo como aperitivos ou em lanche, e outros tipos de produtos nesta categoria como mortadela e o presunto são mais baratos e apreciados pela população. Na Figura 23 encontra-se a frequência de consumo.

Figura 23: Perfil dos provadores em relação à frequência de consumo de salame



5.4.6.2 Teste de aceitação

Na análise sensorial foram avaliados os parâmetros de aparência, aroma e cor dos produtos (3 formulações): uma comercial, com a cultura *E. faecium* e com *L.helveticus*.

De acordo com a literatura (DUTCOSKY, 2007), é considerado resultado favorável quando o Índice de Aceitabilidade (IA) é maior ou igual a 70%. Conforme a Tabela 08, neste estudo foi considerado IA favorável para a formulação com *E. faecium* que apresentou valores de 71,22% para aparência, 74,22% para aroma e 74,44% para cor, enquanto que as outras 2 formulações apresentaram índices de aceitabilidade menor que 70% no parâmetros aparência e aroma (Figura 24).

Tabela 10: Aceitação média das amostras de embutido fermentado atribuída pelos provadores, e resultado do teste de Tukey para comparação de médias.

Amostras	Aparência		Aroma		Cor	
	Médias	% Aceitação	Médias	% Aceitação	Médias	% Aceitação
Padrão	6,17 ^a	68,56	6,63 ^a	73,67	6,48 ^a	72,00
<i>E.faecium</i>	6,50 ^b	71,22	6,68 ^a	74,22	6,70 ^a	74,44
<i>L. helveticus</i>	6,14 ^a	68,22	6,22 ^b	69,11	6,59 ^a	73,22

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si no teste de Tukey ao nível de 5%.

O parâmetro aparência concebe a ideia geral sobre o produto avaliado, unindo aos outros parâmetros avaliados. O resultado do índice de aceitabilidade pode estar relacionado com o observado em algumas fichas sensoriais, onde os provadores descrevem sobre presença de gordura (falta de uniformidade) e também leve deformação (circunferência do salame).

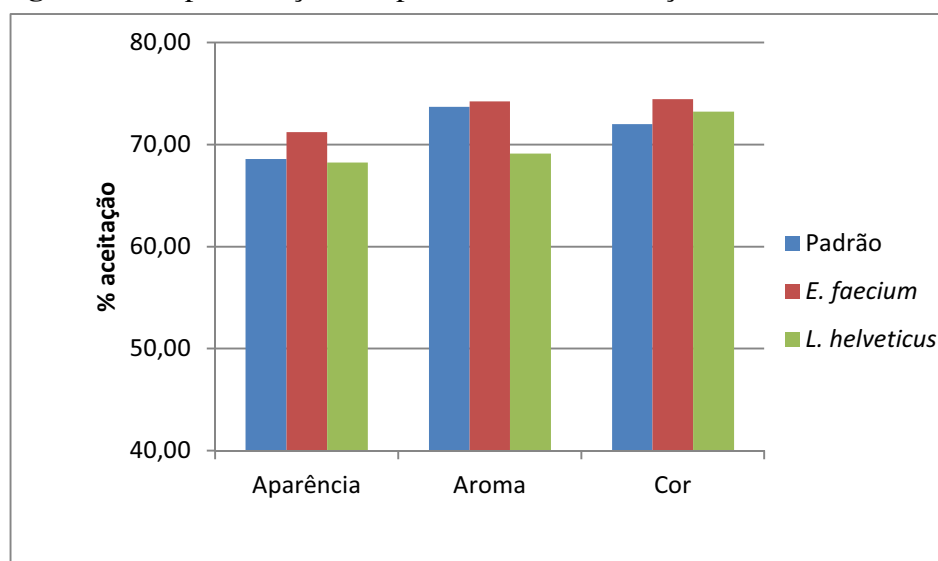
Neste estudo o embutido com a culturas *E. faecium* apresentou um IA favorável para aroma (acima de 70%), enquanto que o embutido adicionado de *L. helveticus* apresentou um valor abaixo do IA. O flavour dos embutidos é resultado do catabolismo microbiano e de enzimas presentes na carne (que degradam carboidratos, lipídeos e proteínas), associadas a condimentos e sais de cura (ERKKILA et al., 2001). Dentre os voláteis que compõem o aroma dos salames têm-se alcanos, alcenos, cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos, ésteres, derivados sulfurosos, terpenos e, com menor importância química, os fenóis, cloretos e pirazinas (CHIZZOLINI, NOVELLI & ZANARDI, 1998).

Os resultados de aceitação poderiam ser superiores se fosse avaliado também o sabor dos embutidos, mas como ainda faltam testes para caracterização das bactérias como probióticos, optou-se por avaliar apenas o aroma dos embutidos.

No quesito cor, as 3 formulações apresentaram índices de aceitabilidade favorável. A cor em produtos curados está relacionada aos sais de cura adicionados nos produtos, onde nitrato é reduzido para nitrito por bactérias com atividade nitrato redutase em pH ácido (4,5-5,5). O nitrito é convertido a óxido nítrico, que combina-se com a mioglobina e forma a mioglobina nitrosa, pigmento vermelho característico de produtos curados (TERRA, 1998).

Pela análise de variância e teste de Tukey, verificou-se que, na avaliação da aparência, a amostra com *E. faecium* diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das demais, e recebeu maior média neste atributo 6,50. Para o atributo aroma, a amostra contendo *L. helveticus* também diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das demais amostras e apresentou menor média 6,22. Com relação à cor não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as amostras, sendo que a processada com *E. faecium* apresentou uma melhor e maior média 6,70.

Figura 24: Representação dos percentuais de aceitação dos atributos avaliados



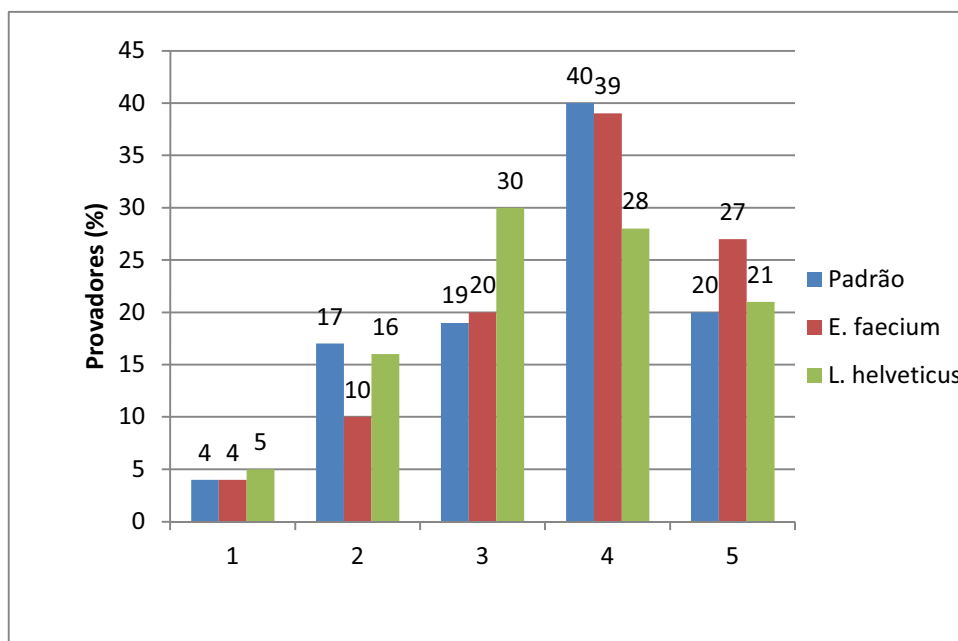
Existem algumas pesquisas de embutidos com adição de culturas probióticas na literatura, onde vale destacar os estudos realizados por Macedo (2005) que avaliou os parâmetros gosto ácido, sabor, aroma, cor, textura e aspecto de embutidos adicionados de *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei*., Andersen (1998) adicionou de *L. casei*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, verificou sabor e aroma de salames e Pidcock; heard; Henriksson (2002) com adição de *L. acidophilus*, *L. paracasei* e *Bifidobacterium lactis* em salame. Pode-se dizer que de uma forma geral as características sensoriais apresentam uma boa aceitabilidade para estes tipos de produtos.

5.4.6.3 Pesquisa de intenção de compra

Simultaneamente com a avaliação sensorial foi avaliada uma intenção de compra dos embutidos, onde os provadores atribuíram notas de 1 a 5, onde 1 correspondia “eu certamente não compraria esta amostra”, 2 “eu provavelmente não compraria esta amostra”, 3 “tenho dúvidas se compraria esta amostra”, 4 “eu provavelmente compraria esta amostra”, e 5 “eu certamente compraria esta amostra”. O embutido com adição de

E. faecium obteve maior porcentagem por parte dos provadores, acima até da amostra usada como padrão (comercial) que está inserida no mercado, conforme mostra a Figura 25.

Figura 25: Representação da intenção de compra das amostras avaliadas.



6. CONCLUSÕES

As cepas *Enterococcus faecium* (ATCC 8459) e *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009) testadas, foram resistentes as concentrações de sais de cura, entretanto a *L. helveticus* apresentou sensibilidade ao cloreto de sódio, o que não foi observado com *E. faecium* possibilitando sua aplicação em produtos curados.

As bactérias quando expostas às condições de estresse, ambas apresentaram boa resistência as concentrações de sais biliares, entretanto a *E. faecium* não manteve sua concentração em valores de pH baixo.

O *L. helveticus* apresentou resistência à maioria dos antibióticos testados, enquanto que *E. faecium* apresentou sensibilidade aos antibióticos.

O embutido processado com as duas bactérias combinadas (*E. faecium* e *L. helveticus*) apresentou diminuição da concentração das bactérias com mais ênfase para a *E. faecium*. Nos processamentos individuais, ambas as bactérias permaneceram com concentração final dentro do recomendado pela legislação.

No controle físico-químico, os parâmetros pH, atividade de água e perda de peso não foram influenciados negativamente pela adição das culturas *starters*. E no controle microbiológico, provavelmente as *L. helveticus* e *E. faecium* inibiram o desenvolvimentos dos micro-organismos patogênicos.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualizar a colonização nos produtos pelas bactérias *E. faecium* e *L. helveticus*, e também sua adesão cárnea.

Na análise de simulação das condições gastrointestinais ambas as bactérias resistiram ao processo, porém reduziu-se sua viabilidade.

As bactérias apresentaram viabilidade dentro do recomendado pela legislação até o final do processo, influenciando positivamente nas características físico-químicas e microbiológicas dos embutidos. A aplicação do teste sensorial aos produtos nos mostrou

boa aceitabilidade para ambos sendo que o embutido que continha o *E. faecium* foi o mais aceito pelos provadores.

Diante de tudo, as bactérias *E. faecium* e *L. helveticus* podem ser adicionadas como *starters* em embutidos, por apresentarem características positivas com relação ao aspecto tecnológico do produto, porém ainda são necessários testes para serem classificados como probióticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S.; SRIVASTAVA, P. K. Quality and shelf life evaluation of fermented sausages of buffalo meat with different levels of heart and fat. **Meat Science**, v. 75, p. 603-603, 2007.

AKALIN, A. S.; GONC, S.; UNAL, G.; FENDERVA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 2, p. 222-227, 2007.

AMMOR, M.; MAYO, B. "Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update". **Meat Science**, v.76, n.1, p.138-146, 2007.

ANDERSEN, L. Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: 44th. International Commitment of Meat Science and Technology (1998: Barcelona). **Anais. Barcelona: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries**, 1998. p. 826-827.

ANDRADE, E. C. B. **Análise de Alimentos uma visão química da nutrição**. São Paulo: Livraria Varela, 2006, 238 p.

ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M; MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p.403-412, 2003.

ARIHARA, K; OTA, H.; ITOH, M.; KONDO, Y.; SAMESHIMA, T.; YAMANAKA, H. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 544-547, 1998.

ARNAUD, A; GIRAUD, I. P. **Bioquímica microbiana**. In: SCRIBAN, R. Biotecnologia. São Paulo: Manole. p.47-102, 1985

ARVANITOYANNIS, I.S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, M.V. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p.385-404, 2005.

BAUER, A. W.; KIRBY, V.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M.; Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BENEVIDES, S.D.; NASSU, R.T. **Embrapa: Produtos cárneos**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000g3izohks02wx5ok0tf2hbweqanedo.html . Acesso 10/10/2013.

Bernardeau, M., Vernoux, J., Henri-Dubernet, P., Guéguen, S.M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**. 126, 278-285, 2008.

BOSCARIOLI, M. P. M. **Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvetes**. **Dissertação de Mestrado** – Programa de Pós-Graduação. Escola de Engenharia Mauá do centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2010.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building**. John Wiley & Sons, Inc. 653 p. ISBN 0-471-09315-7, 1978.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**

(RIISPOA). Aprovado pelo Decreto n. 30.691, alterado pelos Decretos n. 1255 de 25/06/62, 1236 de 02/09/94, 1812 de 08/02/96 e 2244 de 04/06/ 97. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998, republicada no Diário Oficial da União de 22 de março de 1999. Regulamento Técnico: **“Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso paraa categoria 8 – carne e produtos cárneos”**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>. Acesso em 10/01/2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 31 de junho de 2000, Anexo V. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame**. Diário Oficial da União, Brasília, 3 agosto de 2000. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1572>> Acesso em 10/01/2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução - RDC, nº. 12**, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.html. Acesso em: 15/01/2010.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o **Regulamento Técnico de Substancias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegacao de Propriedades Funcional e ou de Saúde**. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 09 de janeiro de 2002. Disponivel em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1567&word=>>>. Acesso em: 05/01/2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. **Manual operacional para comitês de ética em pesquisa**. Brasília, 2005.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substancias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: <

http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm >. Acesso em: 05/01/2010.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 121-129, 2010.

CAMARGO, R. et al. **Tecnologia dos produtos agropecuários- alimentos**. São Paulo: Nobel, 1984, 298p.

CAMPAGNOL, P. C. B.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; SANTOS, B. A.; FURTADO, S. S. Salame elaborado com *Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de cultura de plasma suíno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 883-889, 2007.

CAMPOS, R. M. L. **Influência da alimentação na qualidade da carcaça suína e do pernil para a fabricação de salame tipo italiano**. Santa Maria, 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CASABURI, A.; ARISTOY, M-C; CAVELLA, S.; DI MONACO, R.; ERCOLINI, D.; TOLDRÁ, F.; VILLANI, F. Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. **Meat Science**, v. 76, p.295-307, 2007.

CAVENAGHI, A. D.; OLIVEIRA, M. N. Influência de algumas características físicoquímicas e sensoriais na qualidade do salame tipo italiano fabricado no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, n. 263, p. 44-47, 1999.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Unicamp, 2001, 211p.

CHIZZOLINI, R., NOVELLI, E., & ZANARDI, Z. Oxidation in traditional Mediterranean meat products. **Meat Science**, v. 49, p.87–99,1998.

COELHO, H. S.; SANTANA, A. M.; TERRA, N. N.; MORANDINI, L. M. B. Características físico-químicas do salame tipo italiano contendo couro suíno cozido. **Revista Nacional da Carne**, n. 278, p. 84-96, abr. 2000.

CUNNIFF, P.(Ed.). **Official methods of analysis of AOAC International**. 16. ed. Gaithersburg : AOAC International, 1997, v.1.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. Curitiba: Champagnat, 2007, 239p.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300, 2000.

ERKKILÄ, S; SUIHKO, M. L.; EEROLA, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 205-210, 2001.

FACKLAN, R. R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. Enterococcus. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C. and YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: ASM PRESS, 1999. p. 297-305.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J. A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; HOZ, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Food Science & Technology**, v. 11, p. 201-209, 2001.

FERREIRA, S.M.R.; CAMARGO, L. Aditivos em alimentos. **Boletim do CEPPA**, v. 11, n. 2, p. 159-176, 1993.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations**, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf. Acessado em 22 de março de 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization Working for the Evaluation of Probiotic in Food, Ontario, Canada, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acessado em 22 de março de 2010.

FORREST, J. C.; ABERLE, E. D.; HEDRICK, H. B. JUDGE, M. D.; MERKEL, R. A. **Fundamentos de Ciencia de la Carne**. Zaragoza: Acribia, 1979. 364 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: Ed. Artmed, 2002, 424p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: 2^o Ed. Atheneu, 2003, 182p.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHELEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 105-122, 2003.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacterial.**, Oxford, v.66, p. 365-378, 1989.

GARCIA, F. T.; GAGLEAZZI, U. A.; SOBRAL, P. J. A. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 151-158, 2000.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potencial technological use. **Journal of food Protection**, v.60, p.732-738, 1997.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Influence of starter culture and sugar concentration on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. **Food Microbiology**, v. 20, p. 275-284, 2003.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. New developments in meat starter cultures. **Meat Science**, v. 49, p. 125-138, 1998.

HARDIE, J.; WHILEY, R.. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal Applied Microbiology Symposium Supplement**, v.83, p.1-11, 1997.

HEENAN, C. N.; ADAMS, M. C.; HOSKEN, R. W. Growth medium for culturing Probiotics bacteria for applications in vegetarian food products. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 35, p. 171-176, 2002.

HOFFMANN, F. L., GARCIA-CRUZ, C. H., VINTURIM, T. M.; CARMELLO, M. T. Qualidade microbiológica de amostras de salame. **Boletim CEPPA**, v. 15, p. 57-64, 1997.

HOLZAPFEL, W.M.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**. v. 24, p. 343-362, 1995.

IBÁÑEZ, C.; QUINTANILLA, L.; CID, C.; ASTIASARAN, I.; BELLO, J. Dry fermented sausages elaborated with *Lactobacillus plantarum* – *Staphylococcus carnosus* Part I: Effect of partial replacement of NaCl with KCl on the stability and the nitrosation processes. **Meat Science**, v. 44, p. 227-234, 1996.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed., Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005. 711p.

JERONYMO, A.B.O. **Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala.** São José do Rio Preto, 2013. 108f. Dissertação de Mestrado (Microbiologia)- Universidade Estadual Paulista.

JI, Y.; KIMA, H.; PARK, H.; LEE, J.; LEE, H.; SHIN, H.; KIM, B.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Functionality and safety of lactic bacterial strains from Korean kimchi. **Food Control**, Guildford, v. 31, n. 2, p. 467-473, 2013.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current Issues Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 3, n.2, p. 39-48, 2012.

KASTNER, S.; PERRETEN, V.; BLEULER, H.; HUNGENSCHMIDT, G.; LACROIX, C.; MEILE, L. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.29, n. 2, p. 145-155, 2006.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-86, 1993.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A., SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 44, p. 329-347, 2008.

LAWRIE, R.A. **Meat Science**. 2 ed. Pergamon Press, oxford, 1974.

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

LISERRE, A. M.; RE, M. I.; FRANCO, B. D. G, M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, New York, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2007.

LIZASO, G.; CHASCO, J.; BERIAIN, M.J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**. v.16, p.219-228, 1999.

LJUNGH, A.; WADSTROM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. **Currente Issues in Intestinal Microbiology**, v. 7, p. 73-90, 2006.

LOIR, Y. LE; BARON, F.; GAUTIR, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LORENZO, J. M.; MICHINEL, M.; LÓPEZ, M.; CARBALLO, J. Biochemical Characteristics of Two Spanish Traditional Dry-cured Sausage Varieties: Androlla and Botillo. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 809-817, 2000.

LÜCKE, F. K. Fermented Sausages. **Microbiology of fermented foods**. 2n ed. London: Blackie Academy Professional, v.2, p. 441-483, 1998.

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

MACEDO, R.E.F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. Curitiba, 2005. 193f. Tese de Doutorado (Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná.

MACEDO, R. E. F.; PLANZER, S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Características de culturas lácticas probióticas para uso em produtos cárneos fermentados: sensibilidade aos sais de cura e uso de antibióticos para contagem seletiva. **Boletim CEPPA**, v. 23, n. 1, p. 123-134, 2005.

MACEDO, E.F.R. PFLANZER, S.B.; TERRA, N.N.; FREITAS R.J.S. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.509-519, 2008.

MACEDO, E.F.R.; PFLANZER, S.B.; GOMES, C.L. Probióticos e Prebióticos em alimentos. **Produtos Carneos Probióticos**. 1 ed. São Paulo: Varela. 2011. 669p.

MADI-RAVAZZI, L. **Microscopia eletrônica de varredura com ênfase à análise de amostras biológicas**. Universidade Estadual Paulista – IBILCE – Departamento de Biologia, 2009.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative Staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v. 67, p. 149-158, 2004.

MORETTI, V. M.; MADONIA, G.; DIAFERIA, C.; MENTASTI, T.; PALEARI, M. A.; PANSERI, S.; PIRONE, G.; GANDINI, G. Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical Sicilian salami ripened in different conditions. **Meat Science**, v. 66, p. 845-854, 2004.

MUTHUKUMARASAMY, P. HOLLEY, R. A. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.164-169, 2006.

ORDOÑEZ, J. A.; CAMBERO, M.I.; FERNÁNDEZ, L. et al. **Tecnología de los Alimentos**. v .II. Madrid: Síntesis, 1998. 366p.

ORDOÑEZ, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnología de Alimentos: Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005, 279 p.

PAPAMANOLI, E. TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-

fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v.65, p.859-867, 2003.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H.S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Goiânia: Ed. da UFG, v.1, 2001, 623p.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v. 67, p. 309-317, 2004.

PETERS, J.; MAC.K, WICHMANN-SCHAUER, H., KLEIN, G., ELLERBROEK, L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. **International Journal of food Microbiology**.88, 311-314, 2003.

PIDCOCK, K.; HEARD, G. M.; HENRIKSSON, A. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, n. 1-2, p. 75-81, 2002.

PRÄNDL, O.; FISCHER, A.; SCHMIDHOFER, T.; SINELL, H. J. **Tecnología e Higiene de la Carne**. Zaragoza: Acribia, 1994. 854 p.

RAMUNDO, A.; COUTO, S. M.; LANZILLOTTI, H. S. Elaboração e análise sensorial de linguiças caseiras. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.19, n. 128, 2005.

REDONDO, N.C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. Araraquara, 2008. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual Paulista.

REID, G.; SANDERS, M. E.; GASKINS, H. R.; GIBSON, G. R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v.61, p.91-99, 2003.

RENYE, J. A; SOMKUTI, G. A; PAUL, M.; HEKKEN, D. L. VAN. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 261-8, 2009.

RIUS, N.; SOLE, M.; FRANCIS, A.; LOREN, J.G. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 120, p. 291-296, 1994.

RIVERA-ESPINOSA, Y; GALLARDO –NAVARRO, Y. Non-dairy probiotics products. **Food Microbiology**, v.27, p.1-11, 2010.

ROBERFROID, M.B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, p.2493S-2502S, 2007.

RUIZ, J.N. **Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livres e microencapsulada em salame tipo italiano**. 2011. 125p. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

SAMESHIMA, T.; MAGOME, C.; TAKESHITA, K.; ARIHARA, K.; ITOH, M.; KONDO, Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behavior of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p. 1-7, 1998.

SANTA, O.R.S. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de salame tipo italiano**. 2008. 133p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná.

SANZ, Y.; FLORES, J.; TOLDRA, F.; FERIA, A. Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. **Food Microbiology**, v. 14, p. 575-582, 1997.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of greek feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, n. 1-2, p. 93-105, 2002.

SCHINTTLER, L. **Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite in natura da região oeste de Santa Catarina**. 2012. 92f. Tese de Doutorado (Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas.

SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B. D. G. M. **Atualidades em ciência e tecnologia de carnes**. São Paulo: Livraria Varela, 2006, 236p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S, GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água**. São Paulo: Varela: 4 ed., 2010, 624p.

SILVA, J.A. Ocorrência e controle de *clostridium botulinum* em produtos cárneos curados. **Revista Tecnológica e Ciências de Carnes**, v. 1, n. 1, p. 44-56, 1999.

SIQUEIRA Jr. W. M.; CARELI, R. T.; ANDRADE, N. J.; MENDONÇA, R. C. S. Qualidade microbiológica de equipamentos, utensílios e manipuladores de uma indústria de processamento de carnes. **Revista Nacional da Carne**, v. 326, p.36-46, 2004.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance. **Appetite**, v. 51, p.456-467, 2008.

SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1986. V.2, p.965-1599.

SCHOSSLER, L.S. **Estudo da viabilidade de microrganismo probiótico (*Bifidobacterium lactis*) aplicado em produto cárneo cozido**. 2009. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria.

STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**., vol. 16, p. 196-203, 2005.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 227-235, 2001.

TAVERNITI, V.; GUGLIELMETTI, S. Health- Promoting Properties of *Lactobacillus helveticus*. **Frontiers in Microbiology**, v3, p. 392, 2012.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotics products. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p. 1-10, 2003.

TERRA, N.N. Fermentação como fator de segurança e qualidade para o consumidor. **Revista Nacional da Carne**. v. 239, p.26-32, 1997.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: UNISSINOS, 1998, 216 p.

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

TODOROV, S. D.; FURTADO, D. N.; SAAD, S. M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for

Lactobacillus acidophilus La-14, a potencial probiotic strain. **New Microbiologica**, Pavia, v. 34, n. 4, p. 357-370, 2011c.

TOLDRÁ, F. Sodium reduction in foods: a necessity for a growing sector of the population. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 18, n. 11, p. 583, Nov. 2007.

TORRES, E. A. F. S.; RIMOLI, C. D.; OLIVO, R.; HATANO, M. K.; SHIMOKOMAKI, M. Papel do sal iodado na oxidação lipídica em hambúrgueres bovino e suíno (misto) ou de frango. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 1-7, 1998.

TRINDADE, C.S.F. Probióticos e Prebióticos em alimentos. **Microencapsulação de Probióticos**. 1 ed. São Paulo: Varela. 2011. 669p.

TYÖPPÖNEN, S.; MARKKULA, A.; PETÄJÄ, E.; SUIHKO, M.-L.; MATTILASANDHOLM T. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. **Food Control**, v. 14, p. 181-185, 2003.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotic for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 233-244, 2003b.

VUYST, L.D.; FALONY, G.; LEROY, F.. Probiotics in fermented sausages. **Meat Science**, v. 80, p.75-78, 2008.

WANG,Y. Prebiotics: present and future in food science and technology. **Food Research International**, v.42, p.8-12, 2009.

ANEXO.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa "Aplicação e viabilidade de micro-organismos potencialmente probióticos em embutido cárneo fermentado" sob responsabilidade da pesquisadora Catharina Calochi Pires de Carvalho. O estudo será realizado através de análise sensorial de salame com a avaliação dos parâmetros aparência, aroma e cor. A pesquisa oferecerá risco mínimo à sua saúde, pois os produtos serão avaliados apenas com relação a aparência, aroma e cor, não sendo necessário a ingestão do produto. Você poderá consultar a pesquisadora responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, e estes últimos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. No caso de eventual problema de saúde (efeito adverso) decorrente de sua participação nos testes sensoriais, você será encaminhado à Seção Técnica de Saúde (UNAMOS), situado à Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – São José do Rio Preto/SP – Telefones (17) 3221.2415 – 3221.2416. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações sobre o efeito da adição de diferentes culturas "starters" sobre as características do salame.

Diante das explicações, se você concorda em participar deste projeto, por favor, coloque sua assinatura a seguir e forneça os dados solicitados.

Nome: _____ R.G. _____

Endereço: _____ Fone: _____

e-mail: _____

São José do Rio Preto, _____ de _____ de 20__.

Usuário ou responsável legal

Pesquisador responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador.

Nome: Catharina Calochi Pires de Carvalho	Cargo/Função: Aluna da pós-graduação (Doutorado).
Instituição: Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos/IBILCE/UNESP	
Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jd. Nazareth – São José do Rio Preto/SP	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP	
São José do Rio Preto – fone 17-3221.2545	

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 17 / 04 / 2014

Catharina Abali
Assinatura