

CAMILA VESPÚCIO BIS SOUZA

**ESTUDO DE VIABILIDADE DE CEPAS PROBIÓTICAS COMO BIO-
CONSERVANTES EM EMBUTIDO FERMENTADO COM TEOR REDUZIDO DE
SAL**

Relatório de Pós-doutorado Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas – UNESP, Campus de São José do
Rio Preto.

SUPERVISORA: Prof^a Dra. Andrea Carla Da Silva
Barretto.

CNPQ- PROCESSO N° 150738/2022-6

São José do Rio Preto
2024

RELATÓRIO TÉCNICO FINAL

ESTUDO DE VIABILIDADE DE CEPAS PROBIÓTICAS COMO BIO- CONSERVANTES EM EMBUTIDO FERMENTADO COM TEOR REDUZIDO DE SAL

PROCESSO:150738/2022-6

NOME DO BOLSISTA: Camila Vespúcio Bis Souza

SUPERVISOR: Andrea Carla Da Silva Barretto

INSTITUIÇÃO: Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas – UNESP, Campus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
2024

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	3
2. METODOLOGIA.....	4
2.1. Elaboração das amostras de embutido fermentado.....	4
2.2. Inoculação da <i>Listeria innocua</i>	6
2.3. Metodologia analítica	7
2.4. Análise estatística	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	8
3.1. Avaliação durante o processamento	8
3.2. Análises microbiológicas durante estocagem à 4°C.....	13
4. CONCLUSÃO.....	16
5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADAS A ESSE PROJETO.....	16
6. REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Tornar os produtos cárneos mais saudáveis faz parte de uma tendência justificada pela constante mudança no estilo de vida da população mundial (Bis-Souza et al., 2019a). No entanto, o emprego de estratégias que agradem a este mercado tão exigente, é considerado desafiador entre os pesquisadores da área de alimentos. Já se sabe que é possível reformular produtos cárneos tradicionais tornando-os mais saudáveis através de estratégias tais como (i) modificando alguma etapa do processo, (ii) pela utilização de novas tecnologias, (iii) reduzindo o conteúdo de componentes que devem ser consumidos com restrição pelos consumidores e (iv) pela inclusão de ingredientes funcionais (Bis-Souza et al., 2020). Estas alterações também visam agregar valor ao produto, tanto valor de mercado quanto valor nutritivo.

No entanto, a reformulação pode modificar características tecnológicas e sensoriais no produto final. Inúmeras pesquisas destacam estas possíveis alterações (Pintado et al., 2018; Alejandre et al., 2019; Paglarini et al., 2019; Souza et al., 2019). A estratégia de redução parcial no teor de sal (Lorenzo et al., 2015; Bis et al., 2016; Inguglia et al., 2017; Triki et al., 2017; Barretto et al., 2018; Vidal et al., 2019) é bastante difundida na área científica, entretanto, a promoção da estabilidade microbiológica de um produto fermentado com simultânea redução de sal ainda é uma linha de pesquisa pouco explorada.

Nesse contexto, a incorporação de um microrganismo potencialmente probiótico como um bio conservador em um embutido cárneo fermentado é considerado uma estratégia atual, que requer inúmeros testes em escala laboratorial e apresenta poucos relatos publicados (Tirloni et al., 2014; Moradi et al., 2019). Alguns autores já relataram a aplicação de substâncias antibacterianas (bacteriocinas) produzidas por cepas de BAL. A utilização de cepas de microrganismos direto no alimento não apresenta tantos trabalhos visto que o microrganismo pode causar alterações no produto final. Frente a isso, a proposta do projeto de incorporar BAL em um produto cárneo fermentado tem como objetivo aproveitar os atributos tecnológicos e sensoriais resultantes desta cultura fermentadora.

O controle microbiológico da *Listeria monocytogenes* está relacionado com um problema de saúde pública. A falta de referências que relaciona a utilização de BAL como agente conservante em produto cárneo *ready-to-eat* com teor reduzido de sódio reforça a visão inovadora deste projeto. A determinação dos parâmetros de crescimento de *L. monocytogenes* e a obtenção de resultados científicos considerando as interações com outros microrganismos,

tais como as BALs, são importantes para avaliação e gerenciamento do risco de listeriose. A existência de dados sobre o potencial de crescimento de *L. monocytogenes* em embutidos fermentados com baixo teor de sódio é de grande importância no que diz respeito à proteção da saúde do consumidor.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de bio conservação de BAL potencialmente probióticas em salame tipo italiano com teor reduzido de sal inoculado com *Listeria innocua* durante período de armazenamento sob refrigeração após fatiamento.

2. METODOLOGIA

2.1. Elaboração das amostras de embutido fermentado

Foram utilizadas duas cepas da Coleção de culturas de bactérias ácido lácteas da Universidade Estadual Paulista- Unesp (ccclab-Unesp, wdc1182) *Lactocaseibacillus* SJRP 38 e *Lactocaseibacillus* SJRP 146, e duas cepas comerciais *Lactocaseibacillus paracasei* BGP1(SACCO®) e *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (Chr-Hansen Ind. e Com. Ltda ®). Todas as cepas de BAL foram cultivadas em caldo MRS e armazenado em glicerol 20% estéril em -80° C. As cepas foram reativadas posteriormente em caldo MRS e incubadas a 37° C por 24 horas.

O pernil suíno e o toucinho foram obtidos de comércio local e foram moídos em disco 8 mm, pesados e misturados ao sal e demais ingredientes. Em seguida, foram adicionados os demais ingredientes. Este processo de mistura foi realizado por aproximadamente 5 minutos, mantendo a temperatura da massa próxima a 7°C. Ao final foi adicionado o inóculo contendo a cultura *starter* e a BAL previamente reativada com contagem inicial próxima a 10 log UFC/mL. A massa foi embutida em tripa de celulose com calibre 60 mm, previamente hidratada.

As peças de salame foram amarradas e acomodadas na câmara de maturação (Figura 2). A temperatura da câmara e a umidade relativa foram controladas durante todo o processo de maturação.

As amostras do salame tipo Italiano com teor reduzido de sal e adicionado de BAL foram produzidas conforme a Figura 1, seguindo as formulações descritas na Tabela 1.

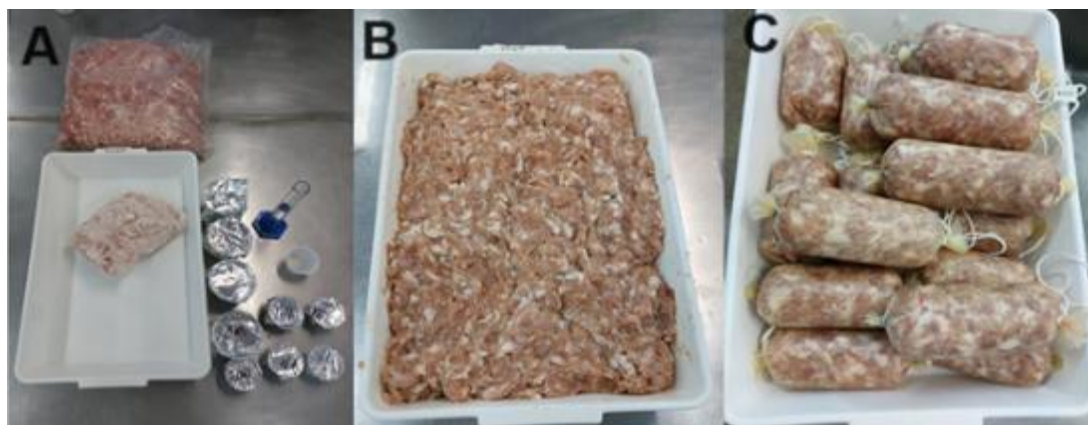


Figura 1. Ilustração do processo produtivo das amostras (A = Separação dos ingredientes, B = Mistura da massa cárnea, C = Amostras embutidas).

Fonte: Pesquisador responsável.



Figura 2. Amostras acondicionadas na câmara de maturação.

Fonte: Pesquisador responsável.

Tabela 1. Diferentes tratamentos do salame tipo Italiano (%).

Ingredientes	C_{ont}	NaR	BGP1	GG	NaRBGP1	NaRGG
Pernil suíno	85	85	85	85	85	85
Toucinho	15	15	15	15	15	15
Cloreto de sódio	2,5	1,88	2,5	2,5	1,88	1,88
Cloreto de potássio	-	0,62	-	-	0,62	0,62
Açúcar	2	2	2	2	2	2
Eritorbato de sódio	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Alho em pó	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Noz moscada	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Pimenta branca	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cultura <i>starter</i>	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Nitrito de sódio	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
Nitrato de sódio	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> BGP1	-	-	0,1	-	0,1	-
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG	-	-	-	0,1	-	0,1

2.2. Inoculação da *Listeria innocua*

A *Listeria innocua* ATCC 33090 foi utilizada para inoculação direta nas amostras de embutido fermentado após fatiamento. O uso do substituto para o microrganismo patogênico *L.monocytogenes* é uma abordagem bastante utilizada quando não é possível a introdução do patógeno em um laboratório de pesquisa. Sendo a cepa de *Listeria innocua* ATCC 33090 mais comumente utilizada como substituta do patógeno *L.monocytogenes* (Hospital et al., 2012; da Silva et al., 2019; Tabanelli et al., 2022).

Após os 21 dias de processamento, as amostras foram fatiadas em ambiente estéril (Câmara de fluxo laminar), dispostas em bandejas de isopor estéreis na porção de 100g para cada amostra, conforme ilustra a Figura 3A. Em seguida foi inoculada 50 µL da solução de *Listeria innocua* ATCC 33090 à 3,0 log UFC/mL e espalhado uniformemente com alça de Drigalski estéril. Para permitir a absorção do inoculo, as fatias foram mantidas em cabine de fluxo laminar por 1 hora em temperatura ambiente. Após inoculação, as bandejas foram embaladas em sacos plásticos de nylon-polietileno e submetidas a selagem a vácuo. Todas as amostras foram estocadas em temperatura de refrigeração (5°C) em BOD específica (Figura 3B).

A contagem total de *Listeria innocua* foi realizada nos tempos 0, 3, 5 e 7 dias de estocagem, conforme a metodologia proposta e descrita no item 2.3.



Figura 3. A: Bandeja de amostra, B: BOD de incubação a 4°C com amostras seladas a vácuo.

2.3. Metodologia analítica

- **Perda de peso** - A perda de peso foi calculada pela diferença de peso das peças de embutido fermentado no momento do embutimento e após o processamento.

- **Determinação de pH** - O valor de pH foi medido usando um pHmetro digital PG 1800, da marca GEHAKA, com solda de penetração.

- **Atividade de água** - A determinação da atividade de água (A_w) foi realizada utilizando um higrômetro elétrico da marca Aqualab (Decagon Devices Inc., Pullman, USA).

- **Oxidação lipídica**- foi determinada pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), segundo a metodologia descrita por VYNCKE et al. (1970), baseado na reação entre os produtos da oxidação com o ácido tiobarbitúrico para formar compostos que podem ser medidos espectrofotometricamente a 532 nm, usando 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP) como padrão e os valores foram expressos em mg de malonaldeído (MDA) / kg de amostra. Foram realizadas três repetições para cada tratamento.

- **Contagem de BAL:** As amostras foram pesadas (10 g) em recipientes plásticos estéreis e misturadas com 90 mL de água salina 0,85% por 2 min. A contagem total de BAL foi obtida utilizando ágar MRS (Difco™) incubado a 37°C/48 h em condições anaeróbicas. *Pedococcus pentosaceus* (Dados não mostrados) foi determinado utilizando ágar MRS modificado (Difco™), adicionado de tetraciclina (Inlab, Alamar Tecno-Científico Ltda.) para garantir a

inibição do crescimento de *Lacticaseibacillus spp.* conforme descrito por Macedo, Pflanzner, Terra, & Freitas (2008). A contagem das cepas potencialmente probióticas de *Lacticaseibacillus paracasei* e *Lacticaseibacillus rhamnosus* adicionado foi determinada pela diferença entre a contagem total de BAL e a contagem de *Pediococcus pentosaceus*, conforme descrito por Macedo et al. (2008). Todas as análises foram realizadas em triplicata nos tempos 0, 3, 10, 15 e 21 dias de processamento. A contagem total de BAL também foi realizada na amostra fatiada, nos dias 0, 3, 5 e 7 dias de incubação a 4°C.

• **Contagem de *Listeria spp.*** Para a contagem de *Listeria spp* foi utilizado o método padrão descrito pela ISO 11290-1:2017, com o meio seletivo Harlequin® *Listeria Chromogenic* Agar (Ottaviani & Agosti) (Neogen) enriquecido com incubação a 37°C/24h. Esta análise foi realizada em triplicata nos dias 0, 3, 5 e 7 dias de estocagem a 4°C.

2.4. Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando o modelo linear GLM, e foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias dos resultados foram avaliados pelo teste de Tukey, a um nível de confiança de 5%.

O processamento dos salames tipo italiano foi realizado em duplicata e os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) utilizando um modelo linear geral, considerando os tratamentos e o tempo como efeito fixo e as repetições como efeito aleatório. As diferenças significativas foram analisadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. O software utilizado foi o *Statistica 7.0*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação durante o processamento

Com base nos resultados obtidos analiticamente, pode-se observar que a utilização das cepas de bactérias ácido lácticas potencialmente probióticas propostas (BGP1 e GG) não alteraram significativamente os valores finais de pH, atividade de água (aw) e perda de peso do produto fermentado, conforme é possível observar nas figuras 4, 5 e 6.

Em relação a queda no valor de pH (acidificação), observou-se um padrão normal para este tipo de produto, independente da adição das cepas de BAL e/ou da redução de cloreto

de sódio. O valor final de pH para todas as formulações se manteve próximo a 4,60 similar ao relatado por Bertici et al. (2023) e Montanari et al. (2018) ao utilizarem BAL em um produto cárneo fermentado tradicional. Resultado similar foi observado na adição de *L. casei* SJRP66 and *L. casei* SJRP169 em salame tipo Italiano com redução no teor de gordura, a qual não afetou significativamente a redução no pH comparado com tratamento controle (Bis-Souza et al., 2020).

Em relação a atividade de água (a_w) e perda de peso não foram observadas diferenças significativas ($P>0.05$) entre os tratamentos para o mesmo tempo de processamento, o que indica que a substituição parcial de cloreto de sódio por cloreto de potássio e adição destas cepas potencialmente probióticas de BAL não afetaram a perda de água (secagem) do produto, etapa muito importante para a conservação deste tipo de produto cárneo.

O valor de perda total de peso no final do tempo de processamento foi similar aos dados relatados em outros estudos realizados com embutido fermentado (Ba et al., 2018; Backes et al., 2013; Savoldi et al., 2019, Bis-Souza et al., 2020).

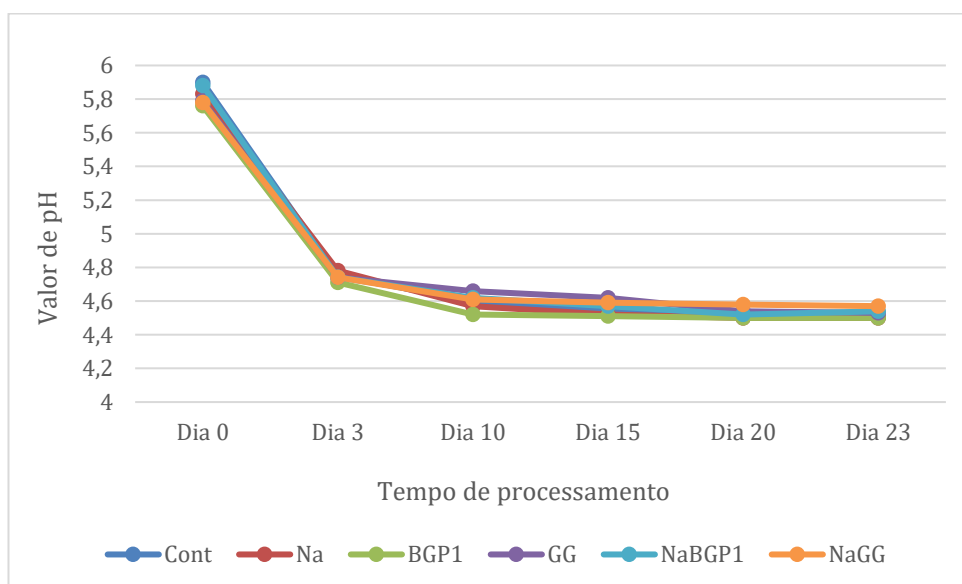


Figura 4. Variação nos valores de pH durante o processamento das amostras de salame tipo Italiano controle, com redução de sódio e adicionados de cepas potencialmente probióticas.

Legenda: **Cont:** Controle sem adição de bactérias ácido láticas; **Na:** Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido láticas; **BGP1:** Adicionado da cepa *Lactacaseibacillus paracasei* BGP1; **GG:** Adicionado da cepa *Lactacaseibacillus rhamnosus* GG; **NaBGP1:** Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lactacaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG:** Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. *Não foi observada diferença significativa nos valores de pH comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey ($P>0,05$).

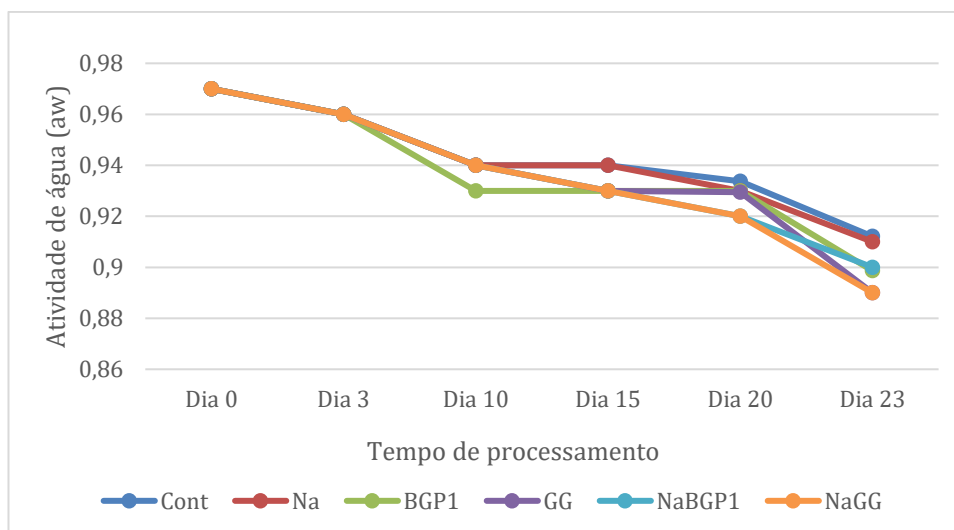


Figura 5. Variação nos valores de atividade de água durante o processamento das amostras de salame tipo Italiano controle, com redução de sódio e adicionados de cepas potencialmente probióticas.

Legenda: **Cont:** Controle sem adição de bactérias ácido láticas; **Na:** Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido láticas; **BGP1:** Adicionado da cepa *Lacticaseibacillus paracasei* BGP1; **GG:** Adicionado da cepa *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG; **NaBGP1:** Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lacticaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG:** Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. *Não foi observada diferença significativa nos valores de atividade de água comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey ($P > 0,05$).

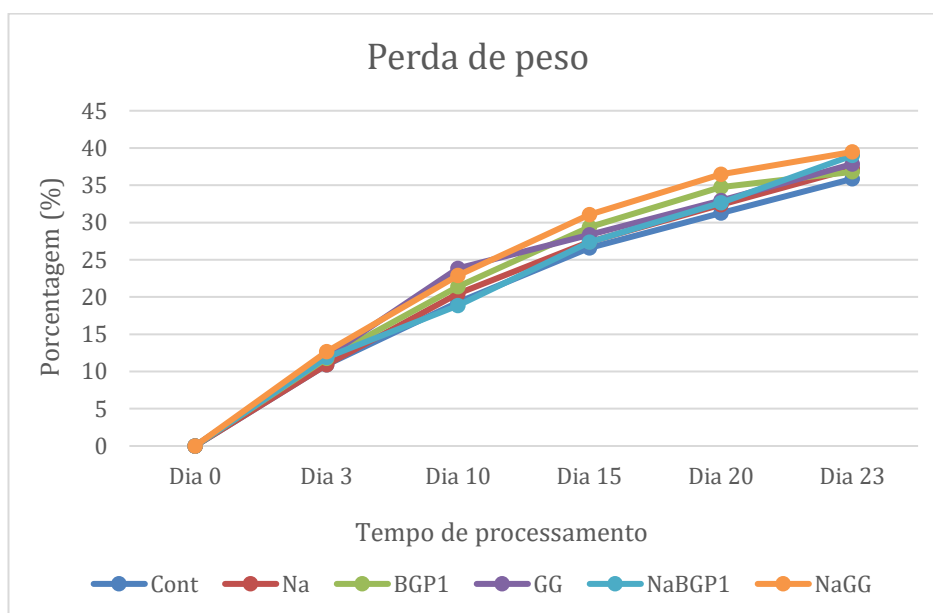


Figura 6. Variação nos valores de perda de peso durante o processamento das amostras de salame tipo Italiano controle, com redução de sódio e adicionados de cepas potencialmente probióticas.

Legenda: **Cont:** Controle sem adição de bactérias ácido láticas; **Na:** Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido láticas; **BGP1:** Adicionado da cepa *Lacticaseibacillus paracasei* BGP1; **GG:** Adicionado da cepa

Lactacaseibacillus rhamnosus GG; **NaBGP1**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lactacaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. *Não foi observada diferença significativa nos valores de perda de peso comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey (P>0,05).

Em relação a avaliação da oxidação lipídica dos tratamentos (Tabela 2), pode-se observar que não houve efeito significativo (P>0,05) da adição de bactérias ácido lácticas comparando com tratamento controle. Ou seja, a utilização destes microrganismos e a redução no teor de sódio da formulação parece não afetar a oxidação lipídica do salame tipo Italiano, o que já era esperado, conforme relatado com estudos anteriores (Libera et al., 2015; Bis-Souza et al., 2020; Bertici et al., 2023).

Tabela 2. Oxidação lipídica durante o processamento (mg de malonaldeído/Kg de amostras).

Amostra	Dia 0	Dia 3	Dia 15	Dia 23
Cont	0,268	0,691	0,798	1,307
Na	0,285	0,696	0,779	1,331
BGP1	0,295	0,739	0,814	1,245
GG	0,261	0,698	0,809	1,193
NaBGP1	0,287	0,732	0,835	1,262
NaGG	0,249	0,748	0,806	1,249
SEM	0,005	0,007	0,008	0,015
<i>P value</i>	ns	ns	ns	ns

Legenda: **Cont**: Controle sem adição de bactérias ácido lácticas; **Na**: Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido lácticas; **BGP1**: Adicionado da cepa *Lactacaseibacillus paracasei* BGP1; **GG**: Adicionado da cepa *Lactacaseibacillus rhamnosus* GG; **NaBGP1**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lactacaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. ^{ns}Não foi observada diferença significativa nos valores de perda de peso comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey (P>0,05).

Sendo assim, pode-se observar que as alterações propostas neste trabalho não afetaram significativamente os principais parâmetros de estabilidade do salame tipo, o que indica uma possível estratégia de reformulação para este tipo de produto.

Este estudo visou a avaliação de duas cepas de microrganismos probióticos comerciais quanto a capacidade de inibição do crescimento de uma cepa patogênica no produto fatiado. No entanto, acredita-se que o acompanhamento do crescimento destas cepas probióticas durante o processamento também é um parâmetro de controle importante. Sendo assim, as tabelas 3 e 4 apresentam os valores contagem de BAL total e probióticos durante o processo de maturação das amostras de salame tipo Italiano.

Tabela 3. Contagem de BAL totais durante processamento (Log UFC/g de amostra).

AMOSTRA	Dia 0	Dia 3	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Dia 23
Cont	7,24 ^b	8,38	7,60	7,45	7,98	7,74
Na	7,42 ^{ab}	8,54	8,07	8,31	8,06	7,93
BGP1	8,02 ^a	8,69	8,36	8,37	8,27	7,46
GG	7,53 ^{ab}	8,82	7,81	8,22	8,16	7,34
NaBGP1	7,42 ^{ab}	8,22	8,35	8,31	8,20	7,66
NaGG	7,19 ^b	8,14	7,21	7,94	8,08	7,89
SEM	0,091	0,075	0,024	0,049	0,049	0,044
<i>P value</i>	0,041	Ns	ns	ns	ns	ns

Legenda: **Cont**: Controle sem adição de bactérias ácido lácticas; **Na**: Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido lácticas; **BGP1**: Adicionado da cepa *Lactocaseibacillus paracasei* BGP1; **GG**: Adicionado da cepa *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG; **NaBGP1**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lactocaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. ^{ns}Não foi observada diferença significativa nos valores de perda de peso comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey ($P>0,05$). ^{ab} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa entre os tratamentos no mesmo período de processamento pelo teste de Tukey ($P\leq 0,05$).

Pode-se observar a contagem total de BAL não sofreu alteração ($P>0,05$) entre os tratamentos quando comparados no mesmo tempo de processamento. Essa diferença foi observada apenas no tempo 0 (dia do processamento) no qual as amostras não tinham sido colocadas na câmara de maturação ainda. Pode-se relacionar este resultado com a adição direta das cepas de microrganismos na massa.

Após 23 dias de processamento observou uma contagem entre 7,34 e 7,93 Log UFC/g, o que representam um resultado satisfatório mesmo com a presença de vários fatores limitantes para o crescimento de BAL (como presença de aditivos -cloreto de sódio e nitrito de sódio, e a baixa atividade de água). Tal resultado está em acordo com os valores apresentado na Tabela 4, a qual apresentam apenas a contagem de probióticos. Comparando as duas tabelas de

resultados, pode-se observar que a redução no teor de sódio adicionado nas formulações não afetou significativamente a viabilidade das BAL, tanto as probióticas quanto a presente na cultura starter.

Resultado similar, em relação a contagem final de BAL em produto cárneo fermentado adicionado de cepas probióticas foi reportado por Sirini et al. (2023), no qual os valores finais também foram próximo a 7 UFC/g.

Tabela 4. Contagem de BAL probióticas durante processamento (Log UFC/g de amostra).

AMOSTRA	Dia 0	Dia 3	Dia 10	Dia 15	Dia 20	Dia 23
BGP1	7,00	7,99	7,72	7,78	8,29	7,29
GG	6,96	7,83	7,39	7,36	8,16	7,51
NaBGP1	6,87	7,90	7,93	7,74	8,15	7,63
NaGG	6,84	7,41	7,75	7,69	8,09	7,79
SEM	0,065	0,078	0,092	0,098	0,046	0,105
<i>P value</i>	ns	Ns	ns	ns	ns	ns

Legenda: **Cont:** Controle sem adição de bactérias ácido lácticas; **Na:** Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido lácticas; **BGP1:** Adicionado da cepa *Lactocaseibacillus paracasei* BGP1; **GG:** Adicionado da cepa *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG; **NaBGP1:** Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lactocaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG:** Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. ^{ns}Não foi observada diferença significativa nos valores de perda de peso comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey (P>0,05).

3.2. Análises microbiológicas do salame tipo Italiano fatiados

Em relação ao controle do pH no salame tipo Italiano após o fatiamento e inoculação da *Listeria innocua* pode-se observar que todos os tratamentos mantiveram os valores de pH durante a estocagem a 5°C, conforme é possível verificar na Tabela 5. Tal estabilidade pode estar relacionada a baixa temperatura de estocagem e a ausência de oxigênio que são fatores limitantes para crescimento microbiano. As tabelas 6 e 7 apresentam esses valores de crescimento microbiano durante o período de estocagem.

Tabela 5. Valores de pH dos salames tipo Italiano fatiados durante estocagem a 4°C (Log UFC/g amostra).

AMOSTRA	DIA 3	Dia 5	Dia7	SEM	<i>P value</i>
Cont	4,51	4,50	4,52	0,02	Ns
Na	4,55	4,58	4,57	0,02	Ns
BGP1	4,57	4,61	4,60	0,33	Ns
GG	4,55	4,62	4,61	0,03	Ns
NaBGP1	4,58	4,59	4,58	0,01	Ns
NaGG	4,58	4,57	4,56	0,01	Ns
SEM	0,03	0,24	0,03		
<i>P value</i>	Ns	Ns	Ns		

Legenda: **Cont**: Controle sem adição de bactérias ácido lácticas; **Na**: Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido lácticas; **BGP1**: Adicionado da cepa *Lacticaseibacillus paracasei* BGP1; **GG**: Adicionado da cepa *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG; **NaBGP1**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lacticaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. ^{ns}Não foi observada diferença significativa nos valores de perda de peso comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey ($P>0,05$).

Em relação a contagem de *Listeria innocua* (Tabela 6) durante o armazenamento das amostras de salame tipo Italiano submetidas ao fatiamento, não se observa diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos. O que sugere que as BAL selecionadas não apresentaram ação bio conservante sobre essa cepa patogêna. Observa-se sim, uma tendência de redução na contagem no dia 7 para os tratamentos com adição das BAL potencialmente probióticas, no entanto na avaliação estatística não foi observada diferença significativa ($P>0,05$).

Em relação a contagem total de BAL (Tabela 7) nas amostras de salame tipo Italiano após serem submetidos ao fatiamento, inoculados com *Listeria innocua* e armazenados sob temperatura de refrigeração, observou-se que após 5 dias de estocagem todos os tratamentos mantiveram os valores de UFC/g similares aos encontrados no dia 0. Pode-se observar, também, uma redução significativa na contagem de BAL totais após 7 dias de estocagem. Indicando que as condições anaeróbicas e a baixa temperatura foram limitantes para o crescimento de ambos os microrganismos avaliados (o patógeno e o bio-conservante).

Para uma cepa de bactéria ácido láctica ser considerada uma cultura bio protetora deve atender alguns critérios, sendo eles apresentar efeito inibitório aos microrganismos patogênicos

de interesse, ser reconhecida como segura (GRAS), se manter estável durante o processamento, distribuição e armazenamento, sem alterar as características sensoriais do produto além de não apresentar risco à saúde do consumidor final (Erfani et al., 2024). Paralelo a isso, existem os fatores extrínsecos (temperatura e umidade) e fatores intrínsecos (matriz alimentar, pH, atividade de água e potencial de oxidação-redução) que pode afetar diretamente o desenvolvimento de uma cultura bio protetora (Leyva Salas et al., 2017). Sendo assim, a realização de estudos em matrizes específicas se faz de extrema importância para a determinação de uma BAL com potencial de bio conservação.

Tabela 6: Contagem de *Listeria innocua* dos salames tipo Italiano fatiados durante estocagem a 4°C (log UFC/g de amostra).

AMOSTRA	Dia 0	DIA 3	Dia 5	Dia7	SEM	<i>P value</i>
Cont	4,74	4,50	4,56	4,10	0,21	Ns
Na	4,71	4,26	4,27	3,93	0,25	Ns
BGP1	4,42	4,32	4,23	2,27	0,40	Ns
GG	4,68	4,23	4,23	2,30	0,42	Ns
NaBGP1	4,36	4,33	4,13	4,08	0,22	Ns
NaGG	4,36	4,25	4,6	4,10	0,22	Ns
SEM	0,17	0,19	0,19	0,34		
<i>P value</i>	ns	ns	ns	ns		

Legenda: **Cont**: Controle sem adição de bactérias ácido lácticas; **Na**: Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido lácticas; **BGP1**: Adicionado da cepa *Lactocaseibacillus paracasei* BGP1; **GG**: Adicionado da cepa *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG; **NaBGP1**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lactocaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. ^{ns}Não foi observada diferença significativa nos valores de perda de peso comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey (P>0,05).

Tabela 7. Contagem de BAL totais dos salames tipo Italiano fatiados durante estocagem a 4°C (log UFC/g de amostra).

AMOSTRA	Dia 0	DIA 3	Dia 5	Dia7	SEM
Cont	10,13 ^{ab}	11,01	10,90	6,80	0,65
Na	10,32 ^a	10,80	11,06	6,85	0,64
BGP1	9,82 ^b	11,14	11,05	7,15	0,56
GG	10,23 ^{ab}	11,02	10,84	7,30	0,61
NaBGP1	10,20 ^{ab}	10,98	10,77	7,30	0,62
NaGG	10,11 ^{ab}	11,28	11,02	7,15	0,56
SEM	0,05	0,05	0,04	0,07	
<i>P value</i>	0,02	ns	Ns	ns	

Legenda: **Cont**: Controle sem adição de bactérias ácido lácticas; **Na**: Redução no teor de sódio adicionado sem adição de bactérias ácido lácticas; **BGP1**: Adicionado da cepa *Lacticaseibacillus paracasei* BGP1; **GG**: Adicionado da cepa *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG; **NaBGP1**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *Lacticaseibacillus paracasei* BGP1; **NaGG**: Redução no teor de sódio adicionado da cepa *rhamnosus* GG. ^{ns}Não foi observada diferença significativa nos valores de perda de peso comprando as amostras no mesmo período de processamento no teste de Tukey ($P>0,05$). ^{ab} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa no teste de Tukey ($P<0,05$).

4. CONCLUSÃO

A aplicação destas cepas probióticas em salames tipo Italiano com redução no teor de sal garantiu características tecnológicas similares ao salame controle submetidos ao fatiamento. Sendo assim, os resultados apresentados indicam um potencial de bio conservação das cepas estudadas em produto cárneo fermentado, incentivando a possibilidade de estudos com outras cepas específicas que possam apresentar igual ou maior viabilidade como bio conservantes em um produto cárneo com teor reduzido de sódio, tema de interesse devido ao aumento da susceptibilidade a contaminações microbiológicas pelo sal ser um conservante reconhecido, de eficiência comprovada.

5. PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADAS A ESSE PROJETO

- Artigo publicado em periódico internacional: Bertuci, M. L., Alves Junior, C. A., Souza, C. V. B., Penna, A. L. B., Barretto, A. C. S. Bio preservation capacity of potentially probiotic

Lactocaseibacillus strains in fermented sausage. **International Journal of Food Science and Technology**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16726>.

- Resumo expandido publicado em anais de congresso: Marcello L. Bertuci, Carlos A. Alves-Junior, Camila V. Bis-Souza and Andrea C. Silva. Barretto. Viability of the application of potential probiotic *Lactobacillus casei* in salami. 69th International Congress of Meat Science and Technology, August 20-25, Padova, Italy. Pag 510-511.

- Participação de congresso: I Simpósio de Engenharia, Ciência de Alimentos e Nutrição (SECAN). São José do Rio Preto- SP- Brasil. maio de 2023.

- Participação em minicurso: Título: Probióticos e prebióticos: efeitos na saúde e desafios para aplicação em alimentos. Carga horária: 4 horas, I Simpósio de Engenharia, Ciência de Alimentos e Nutrição (SECAN). São José do Rio Preto- SP- Brasil. maio de 2023.

- Resumo em anais de congresso: Marcello L. Bertuci, Carlos A. Alves-Junior, Camila V. Bis-Souza and Andrea C. Silva. Barretto. Avaliação in vitro do potencial de aplicação de cepas probióticas em salame- Concentrações de aditivo. I SECAN- Simpósio de Engenharia, Ciência de Alimentos e Nutrição, maio, São José do Rio Preto, Brasil, Pag. 90.

- Resumo em anais de congresso: Marcello L. Bertuci, Carlos A. Alves-Junior, Camila V. Bis-Souza and Andrea C. Silva. Barretto. Avaliação in vitro do potencial de aplicação de cepas probióticas em salame- Diferentes pH. I SECAN- Simpósio de Engenharia, Ciência de Alimentos e Nutrição, maio, São José do Rio Preto, Brasil, Pag. 91.

6. REFERENCIAS

ALEJANDRE, M., ASTIASARÁN, I., ANSORENA, D., BARBUT, S. Using canola oil hydrogels and organogels to reduce saturated animal fat in meat batters. **Food Research International**, v. 122, n.1, p. 129-136, 2019.

BA, H. V., SEO, H. W., SEONG, P. N., KANG, S. M., KIM, Y. S., CHO, S. H., KIM, J. H. *Lactobacillus plantarum* (KACC 92189) as a potential probiotic starter culture for quality improvement of fermented sausages. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v.38, p. 189-202, 2018.

BACKES, A. M., TERRA, N. N., MILANI, L. I. G., DE SOUZA REZER, A. P., LUDTKE, F. L., CAVALHEIRO, C. P., FRIES, L. L. M. Physico-chemical characteristics and sensory acceptance of Italian type salami with canola oil addition. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, p.3709-3720, 2013.

BARRETTO, T. L., POLLONIO, M. A. R., TELIS-ROMERO, J., BARRETTO, A. C. S. Improving sensory acceptance and physicochemical properties by ultrasound application to restructured cooked ham with salt reduction. **Meat Science**, v.145, n.1, p.55-62, 2018.

BERTUCI, M. L., ALVES JUNIOR, C. A., SOUZA, C. V. B., PENNA, A. L. B., BARRETTO, A. C. S. Bio preservation capacity of potentially probiotic *Lactocaseibacillus* strains in fermented sausage. **International Journal of Food Science and Technology**, v.58, p.6253-6262, 2023

BIS, C. V., BARRETTO, T. L., HENCK, J. M. M., MATHIAS, J. C., OLIVEIRA, L. S., BARRETTO, A. C. S. Physicochemical characteristics and sensory acceptability of ready-to-eat sliced frozen roast beef with partial reduction of sodium chloride. **Food Science and Technology**, v.36, n.2, p.286-289, 2016.

BIS-SOUZA, C. V., BARBA F. J., LORENZO J. M., PENNA, A. L. B., BARRETTO A. C. S. New strategies for the development of innovative fermented meat products: a review regarding the incorporation of probiotics and dietary fibers. **Food Reviews International**, v.35, n.5, p.467-484, 2019.

BIS-SOUZA, C.V., PENNA, A. L. B., BARRETTO, A. C. S. Applicability of potentially probiotic *Lactobacillus casei* in low-fat Italian type salami: screening in vitro and technological evaluation. **Meat Science**, v.168, 108186, 2020.

Da SILVA, A. C., PENA, P. O., PFLANZER J., S. B., NASCIMENTO, M. S. Effect of different dry aging temperatures on *Listeria innocua* as surrogate for *Listeria monocytogenes*. **Meat Science**, v. 157, 107884, 2019.

ERFANI, A., SHAKERI, G., MOGHIMA, M., AFSHARI, A. Specific species of probiotic bacteria as bio-preservative cultures for control of fungal contamination and spoilage in dairy products. **International Dairy Journal**, v.151, 105863, 2024.

HOSPITAL, X., F., HEIRRO, E., FERNÁNDEZ, M. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p.395-401, 2012.

INGUGLIA, E. S., ZHANG, Z., TIWARI, B. K., KERRY, J. P., BURGESS, C. M. Salt reduction strategies in processed meat products- A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.59, n.1, p.70-78, 2017.

LEYVA SALAS, M., MOUNIER, J., VALENCE, F., COTON, M., THIERRY, A., COTON, E. Antifungal microbial agents for food bio preservation A review. **Microorganisms**, v.5, 37, 2017.

LIBERA, J., KARWOWSKA, M., STASIAK, D. M., DOLATOWSKI, Z. J. Microbiological and physicochemical properties of dry-cured neck inoculated with probiotic of *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB-12. **International Journal of Food Science and Technology**, v.50, p.1560-1566, 2015.

LORENZO, J. M., CITTADINI, A., BERMÚDEZ, R., MUNEKATA, P. E., DOMÍNGUEZ, R. Influence of partial replacement of NaCl with KCl, CaCl₂ and MgCl₂ on Proteolysis, lipolysis and sensory properties during the manufacture of dry-cured lacón. **Food Control**, v. 55, n.1, p.90-96, 2015.

MONTANARI, C., GATTO, V., TORRIANI, S., BARBIERI, F., BARGOSS, E., LANCIOTTI, R., GARDINI, F. Effects of the diameter on physico-chemical, microbiological and volatile profile in dry fermented sausages produced with two different starter cultures. **Food Bioscience**, 22, 9-18, 2018.

MORADI, M., MARDANI, K., TAJIK, H. Characterization and application of postbiotics of *Lactobacillus spp.* on *Listeria monocytogenes* in vitro and in food models. **LWT- Food Science and Technology**, v.111, n.1, p.457-464, 2019.

PAGLARINI, C. S., MARTINI, S., POLLONIO, M. A. R. Using emulsion gels made with sonicated soy protein isolate dispersions to replace fat in frankfurters. **LWT- Food Science and Technology**, v.99, n.1, p.453-459, 2019.

PINTADO, T., HERRERO, A. M., JIMÉNEZ-COLMENERO, F., PASQUALIN CAVALHEIRO, C., RUIZ-CAPILLAS, C. Chia and oat emulsion gels as new animal fat replacers and healthy bioactive sources in fresh sausage formulation. **Meat Science**, v.135, n.1, p. 6-13, 2018.

SAVOLDI, D. C., KUNRATH, C. A., OLIVEIRA, D. F., NOVELLO, C. R., COELHO, A. R., MARCHI, J. F., TONIAL, I. B. Physical and sensory characteristics of Italian-type salami with propolis addition. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.18, p.212-221, 2019.

SIRINI, N., STEGMAYER, M., RUIZ, M. J., CUFFIA, F., ROSSLER, E., OTERO, J., SOTO, L., LORENZO, J. M., PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A., ROSMINI, M., FRIZZO, L.

Applicability of the probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* BFL as an adjunct culture in a dry fermented sausage. **Meat Science**, v.200, p.109166, 2023.

SOUZA, C. V. B., BELLUCCI, E. R. B., LORENZO, J. M., BARRETTO, A. C. S. Low-fat Brazilian cooked sausage-Paio – with added oat fiber and inulin as a fat substitute: effect on the technological properties and sensory acceptance. **Food Science and Technology**, v.39, 295-303, 2019.

TABANELLI, G., BARBIERI, F., SOGLIA, F., MAGNANI, R., GARDINI, G., PETRACCI, M., GARDINI, F., & MONTANARI, C. Safety and technological issues of dry fermented sausages produced without nitrate and nitrite. **Food Research International**, v.160, 111685, 2022.

TIRLONI, E., CATTANEO, P., RIPAMONTI, B., AGAZZI, A., BERSANI, C., STELLA, S. In vitro evaluation of *Lactobacillus animalis* SB310, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SB137 and their mixtures as potential bioprotective agents for raw meat. **Food Control**, v.41, n.1, p.63-68, 2014.

TRIKI, M., KHEMAKHEM, I., TRIGUI, I., BEN SALAH, R., JABALLI, S., RUIZ-CAPILLAS, C., AYADI, M. A., ATTIA, H., BESBES, S. Free-sodium salts mixture and AlgySalt® use as NaCl substitutes in fresh and cooked meat products intended for the hypertensive population. **Meat Science**, v.133, n.1, p.194-203, 2017.

VIDAL, V. A. S., BIACHI, J. P., PAGLARINI, C. S., PINTON, M. B., CAMPAGNOL, P. C. B., ESMERINO, E. A., CRUZ, A. G., MORGANO, M. A., POLLONIO, M. A. R. Reducing 50% Sodium Chloride in healthier jerked beef: A efficient design to ensure suitable stability, technological and sensory properties. **Meat Science**, v.152, n.1, p.49-57, 2019.