



**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**



**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara**

**Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado,
com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através
da utilização de culturas probióticas**

Mariana Nougalli Roselino

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de
Doutora em Alimentos e Nutrição.**

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino
Cavallini**

**Araraquara
2016**

Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas

Mariana Nougalli Roselino

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de
Doutora em Alimentos e Nutrição.**

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino
Cavallini**

Araraquara

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R811d

Roselino, Mariana Nougalli

Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas / Mariana Nougalli Roselino. – Araraquara, 2016
197 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

1. Probióticos. 2. Fermentação. 3. Conservação. 4. Embutido cárneo. 4. Nitrito. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Título.

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini (Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Carmen Silvia Fávaro Trindade

Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi

Prof^a. Dr^a. Juliana Neves Rodrigues Ract

Prof^a. Dr^a. Renata Tieko Nassu

Araraquara

2016

*Dedico meu trabalho aos meus queridos e inesquecíveis avós, Antonia e Ary
e aos meus pais, Rose e Rui, pela confiança e todo amor.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu a oportunidade deste aprendizado e que me permite evoluir diariamente.

Aos meus queridos avós, Antonia e Ary, que preencheram minha vida com muito carinho e dedicação.

Aos meus pais, Rose e Rui, que sempre me incentivaram em todo caminho escolhido, me dando suporte pra não desistir e ir sempre mais longe.

A Prof^a. Dr^a. Daniela Cavallini, pela orientação e por acreditar no meu potencial de desenvolver este trabalho, pela amizade e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Elizeu Rossi, simplesmente, por ser quem é, único e um grande exemplo.

Às amigas Izabela, Josiane e Roseli, por serem presentes, me escutarem e me ajudarem sempre que precisei.

Aos estagiários Jéssica, Matheus e Thaís, por toda a ajuda que deram em meu trabalho e por serem tão queridos.

Às amigas Camilla e Marly, que foram fundamentais no início do projeto, me dando suporte nas tentativas e me auxiliando na busca de soluções.

À UNICAM, que me recebeu por 6 meses na Itália. Ao meu supervisor Dr. Sauro Vittori, ao Dr. Gianni Sagratini e a Dr^a. Veronica Sirocchi por todos os ensinamentos. E a todos colegas de laboratório que foram fundamentais nesta etapa de vida.

À mia coinquilina: Alida e amiche mie: Angélica, Irene e Maria Rosaria, por todo carinho, ajuda e por serem uma família neste período longe de casa, em Camerino.

À família Cancian Vieira: Du, Dani, Gi, Giu e Grazi, que me permitiram fazer parte da família deles, por serem amigos tão queridos, disponíveis e carinhosos.

À família Real União, que esteve presente nestes anos me dando força para jamais abaixar a cabeça e nunca desistir.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição, pela contribuição direta ou indireta para realização deste trabalho.

À Seção de Pós-Graduação e aos funcionários da Biblioteca da FCFAr, pela atenção e ajuda.

À Dr^a. Maria Angela do Departamento de Engenharia Ambiental da EESC/USP, pelo auxílio nas análises de ácidos graxos de cadeia curta.

À Dr^a. Izabel Kimiko Sakamoto do Departamento de Engenharia Ambiental da EESC/USP, por me receber tão bem, pelos ensinamentos e dedicação nas análises de DGGE realizadas.

À Prof^a. Dr^a. Juliana Neves Rodrigues Ract do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP pelas análises de ácidos graxos realizadas.

À Dr^a. Graciela Font de Valdez do Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA) na Argentina pela disponibilização das cepas probióticas utilizadas no projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo auxílio à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa PDSE para estágio doutorado no exterior.

A todos que sempre torceram por mim, acreditando em meu potencial de superar meus limites e seguir em frente.

*“Procure ser um homem de valor em vez de ser um homem de
sucesso.” – Albert Einstein*

Resumo

Embutidos fermentados, processados e consumidos sem aquecimento, são os produtos cárneos mais promissores para a veiculação de probióticos, entretanto, apresentam como desvantagens o alto teor de gordura, presença de nitrito e nitrato residual e de compostos potencialmente tóxicos, como as aminas bioativas. O presente trabalho estudou o efeito da utilização de bactérias lácticas com propriedade hipolipemiante nas características tecnológicas, sensoriais e de segurança de um embutido cárneo fermentado, similar ao salame, com teores de gordura, nitrito e nitrato reduzidos. Os potenciais efeitos benéficos do produto foram investigados em um estudo *in vitro*. Duas cepas probióticas (*Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL1014) foram testadas, separadamente, como culturas iniciadoras. Os embutidos com baixo teor de gordura (redução de 60%) foram processados em seis formulações: 2 - culturas tradicionais sem redução de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%); 3 - culturas tradicionais e teor reduzido de sais de cura (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%); 4, 5, 6, 7 – culturas probióticas (*E. faecium* CRL183 e *L. acidophilus* CRL1014) com teores normais e reduzidos de sais de cura, respectivamente. Para efeito de comparação, um produto controle (1 - culturas tradicionais, sem redução de gordura e de sais de cura) também foi produzido. As culturas probióticas (*Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014) foram submetidas a testes preliminares para determinação da resistência às concentrações de sais de cura usualmente empregadas em produtos cárneos fermentados e avaliação da capacidade de produção de substâncias antimicrobianas pela técnica *spot-on-lawn*. A qualidade dos embutidos foi avaliada através de análises físico-químicas e microbiológicas, no início do processamento e durante os períodos de maturação e estocagem. Foram realizados testes de aceitação a cada 30 dias de armazenamento e, uma análise descritiva quantitativa (ADQ) com os embutidos prontos para o consumo (T30). O embutido que apresentou as melhores características nos testes anteriores foi submetido a um teste *in vitro*, em simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), para avaliação da sobrevivência gastrointestinal do microrganismo probiótico, determinação do efeito do produto cárneo probiótico na produção de ácidos graxos de cadeia curta e de amônia e na modulação da microbiota intestinal. Nas análises de sensibilidades aos sais de cura, a cepa *E. faecium* CRL 183 não exibiu redução logarítmica na população de células viáveis (10^9 UFC/mL) para todas as concentrações de cloreto de sódio e nitrito de sódio avaliadas. Por outro lado, a cepa *L. acidophilus* CRL 1014 apresentou redução de um ciclo logarítmico em relação ao controle ($p < 0,05$), com população final de células viáveis na ordem de 10^8 UFC/mL. As bactérias probióticas avaliadas não foram capazes de produzir substâncias antimicrobianas contra as cepas indicadoras utilizadas (*Listeria monocytogenes* IAL 628, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *typhimurium* IAL 2431, e *Escherichia coli* IAL 339), uma vez que não houve formação de halos de inibição. Todas as formulações apresentaram características físico-químicas e microbiológicas adequadas aos padrões estabelecidos para embutidos cárneos fermentados. As cepas probióticas mantiveram-se viáveis até o final do período avaliado, exibindo população na ordem de 10^8 UFC/g (final da maturação) e 10^7 UFC/g (120 dias de armazenamento). Os resultados obtidos evidenciaram um comportamento muito semelhante entre as diferentes formulações, indicando que a substituição de culturas iniciadoras tradicionais por outras probióticas, bem como a redução de sais de cura, não influenciou negativamente a qualidade microbiológica dos produtos. A substituição parcial de gordura animal por óleo de oliva resultou em aumento de dureza, fato que não alterou a aceitação hedônica global das amostras. A ADQ não foi capaz de diferenciar as amostras em função da cepa utilizada e da quantidade de sais de cura adicionada. Entre os embutidos com redução de gordura e sais de cura e potencialmente probióticos, o produto fermentado com *E. faecium* CRL 183 (F5) apresentou, no final do período de armazenamento (T120), algumas características superiores as do produto fermentado com *L. acidophilus* CRL1014 (F7) – menor população de estafilococos coagulase positiva, menor oxidação lipídica, melhor perfil de textura e de aminas bioativas – sendo por esse motivo selecionado para a segunda etapa do estudo. Os testes utilizando o simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH) evidenciaram que o consumo do produto fermentado com *E. faecium* CRL 183 e com redução de

gordura e sais de cura pode resultar em redução de *Lactobacillus* spp. (cólon ascendente, transverso e descendente), *Bacteroides* spp. (cólon descendente) e enterobactérias (cólon transverso e descendente) e aumento nos níveis de íons amônio. O mesmo produto probiótico estimulou a produção de ácido butírico e propiônico, reduziu a concentração de ácido acético durante a fase de tratamento e alterou a população de microrganismos intestinais. Os resultados indicam que o salame probiótico (*E. faecium* CRL 183) com redução de gordura e sais de cura constitui uma alternativa mais saudável de produto cárneo fermentado, pois, além de possuir características nutricionais mais interessantes, apresenta potencial para atuar positivamente no perfil lipídico, através da melhora na produção de AGCC e modulação da microbiota, com aumento da população de *E. faecium* CRL 183 que é uma cepa comprovadamente hipocolesterolemiantes.

Palavras-chave: probióticos; fermentação; conservação; embutido cárneo; nitrito.

Abstract

Fermented sausages, processed and consumed without heating, are the most promising meat products for the placement of probiotics, however, have as disadvantages the high fat content and the presence of residual nitrite and nitrate and potentially toxic compounds, such as bioactive amines. This work studied the effect of using lactic acid bacteria with lipid lowering property in technological, sensory and safety characteristics of a fermented sausage, similar to salami with fat, nitrite and nitrate reduced. The potential beneficial effects of the product were investigated in an *in vitro* study. Two probiotic strains (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014) were tested separately as starter cultures. The sausages with a low fat content (60% reduction) were processed in six treatments: 2 - traditional cultures with fat reduction and without curing salts reduction (nitrite and nitrate 0.015% 0.005%); 3 - traditional cultures with fat and curing salt reduction (nitrite and nitrate 0.007% 0.003%); 4, 5, 6, 7 - probiotic cultures (*E. faecium* CRL183 and *L. acidophilus* CRL1014) with fat reduction, without and with curing salt reduction, respectively. For comparison, a control product (1 - traditional cultures without fat and curing salts reduction) was also produced. Probiotic cultures (*E. faecium* CRL 183 and *L. acidophilus* CRL 1014) were submitted to preliminary tests to determine resistance to curing salt concentrations usually employed in fermented meat products and evaluation of antimicrobial substances production capacity by the spot-on-lawn technique. The quality of the sausages was evaluated by physical, chemical and microbiological analyzes at the beginning of processing and during periods of maturation and storage. Acceptance tests were performed every 30 days of storage, and a quantitative descriptive analysis (QDA) with sausages ready for consumption (T30). The sausage had the best characteristics of previous tests was subjected to an *in vitro* test on human microbial ecosystem simulator (SEMH) for evaluation of the gastrointestinal survival of the probiotic microorganism, determining the effect of probiotic meat product in the production of fatty acids short chain and ammonia and modulation of the intestinal microbiota. In the analysis of sensitivity to curing salts, *E. faecium* CRL 183 showed no log reduction in the population of viable cells (10^9 CFU/mL) for all concentrations of sodium chloride and sodium nitrite evaluated. On the other hand, *L. acidophilus* CRL 1014 showed a log cycle reduction compared to control ($p < 0.05$) with final population of viable cells in the order of 10^8 CFU/mL. The evaluated probiotic bacteria were not able to produce antimicrobial substances against indicator strains (*Listeria monocytogenes* IAL 628, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *typhimurium* IAL 2431, e *Escherichia coli* IAL 339), since there was no formation of inhibition zones. The results show that *E. faecium* CRL 183 and *L. acidophilus* CRL 1014 can be used as starter cultures in the preparation of meat sausages, they are tolerant to sodium chloride and sodium nitrite concentrations typically used in such products. All treatments showed appropriate physicochemical and microbiological characteristics to the standards established for fermented sausage. The probiotic cultures remained viable by the end of analysis period, showing a population of about 10^8 UFC/g (final ripening) and 10^7 UFC/g (120 days of storage). The results obtained showed a very similar behavior between the different treatments, indicating that replacement of traditional starter cultures by probiotic as well as the curing salts reduction did not influence the microbiological quality of products. The partial replacement of animal fats with olive oil resulted in increased hardness, which did not alter the overall hedonic acceptance of samples. The QDA was not able to differentiate between samples depending on the strain used and the amount of added curing salts. Among treatments with fat and curing salts reduction and potentially probiotics, the fermented product with *E. faecium* CRL 183 (F5) presented at the end of the storage period, some superior characteristics to the product fermented with *L. acidophilus* CRL1014 (F7) - smaller population of coagulase positive staphylococci, lower lipid oxidation, better texture profile and better bioactive amines profile - and therefore selected for the second stage of the study. Tests using the SEMH showed that the fermented product consumption with *E. faecium* CRL 183 with fat and curing salts reduction may result in areducing *Lactobacillus* spp. (ascending, transverse and descending colon), *Bacteroides* spp. (descending colon) and *Enterobacteriaceae* (transverse and descending colon) and increased levels

of ammonium ions. The same probiotic product stimulated the production of butyric and propionic acid, reduced the concentration of acetic acid during the treatment phase and altered the population of intestinal microorganisms. The results indicate that the probiotic sausage (*E. faecium* CRL 183), with fat and curing salts reduction is a healthier alternative of fermented meat product, since, besides having more interesting nutritional characteristics, has the potential to act in lipid profile, by improving the production of SCFA and modulating the microbiota with increased *E. faecium* CRL 183 population which is a proven cholesterol lowering strain.

Keywords: probiotics; fermentation; conservation; sausage; nitrite.

Lista de tabelas

Tabela 1.	Formulação dos embutidos com substituição da gordura animal por óleo de oliva...	39
Tabela 2.	Condições operacionais de processamento dos embutidos cárneos.....	42
Tabela 3.	Valores de volume, tempo de residência e pH estabelecidos em cada um dos reatores do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH).....	51
Tabela 4.	Composição do meio alimentar basal dissolvido em água destilada.....	52
Tabela 5.	População de células viáveis de <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1014 (log UFC/mL), frente às diferentes concentrações de NaCl e NaNO ₂	58
Tabela 6.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) para perda de peso (%), acidez titulável (mL de NaOH/100g), atividade de água e pH ao longo do período de estudo.....	63
Tabela 7.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) para composição centesimal (g/100g) e teor calórico (Kcal) das diferentes formulações no início do estudo (T0), final do período de maturação (T30) e final do período de armazenamento (T120).....	66
Tabela 8.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) de TBARS (mg/kg) para as diferentes formulações e etapas de processamento.....	70
Tabela 9.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) obtidas no teste TPA (Texture Profile Analysis), para os parâmetros de dureza (N), coesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade, para as diferentes formulações e etapas de processamento.....	73
Tabela 10.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) das aminas bioativas (ppm) para as diferentes formulações e etapas de processamento.....	80
Tabela 11.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) obtidos no Perfil de Ácidos Graxos para as diferentes formulações e etapas de processamento.....	90
Tabela 12.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) para população de microrganismos potencialmente patogênicos – segurança microbiológica.....	91
Tabela 13.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) das notas obtidas nos testes de aceitação de cada atributo avaliado nas diferentes formulações.....	95
Tabela 14.	Definições e referências para os atributos sensoriais das amostras do salame tipo italiano.....	100
Tabela 15.	Níveis de significância (p) para cada assessor em função de discriminação das amostras (p de F _{amostra}).....	101
Tabela 16.	Níveis de significância (p) para cada assessor em função da repetibilidade (p de F _{repetição}).....	102
Tabela 17.	Resultados da ADQ (médias $\pm$ desvios padrões) das diferentes formulações de embutidos cárneos.....	108
Tabela 18.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) das contagens (log UFC/mL) dos diferentes grupos bacterianos, nos reatores 3, 4 e 5, que simulam o cólon ascendente, transversal e descendente durante o período experimental no simulador do ecossistema microbiano humano.....	113
Tabela 19.	Concentrações médias ($\pm$ desvios padrões) de íons amônio (ppm) produzidos nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversal e descendente do cólon durante o período experimental no simulador do ecossistema microbiano humano.....	120

Lista de figuras

Figura 1.	Fluxograma de processamento dos embutidos cárneos.....	41
Figura 2.	Obtenção dos produtos cárneos fermentados.....	41
Figura 3.	Representação dos Reatores do simulador do ecossistema microbiano humano.....	52
Figura 4.	Teste <i>spot-on-law</i> para verificação de produção de substâncias antimicrobianas. Placa com ausência de halo de inibição.....	59
Figura 5.	Determinação das condições ideais de processamento dos embutidos.....	60
Figura 6.	Valores médios ($\pm$ desvios padrões) de L^* , a^* e b^* para as diferentes formulações...	69
Figura 7.	Concentrações médias ($\pm$ desvios padrões) de aminas bioativas (ppm) para as diferentes formulações.....	77
Figura 8.	Médias ($\pm$ desvios padrões) para população de <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp. (log UFC/g).....	89
Figura 9.	Distribuição da frequência das notas correspondentes à escala utilizada para avaliar a intenção de compra nos produtos prontos para o consumo (T30) e durante o período de armazenamento (T60, T90 e T120).....	97
Figura 10.	Avaliação do consenso com a equipe para os atributos cor (A), quantidade de gordura (B), sabor ácido (C) e sabor de ranço (D).....	103
Figura 11.	Gráfico aranha com as médias dos atributos das amostras de salames.....	104
Figura 12.	Gráfico de ACP das diferentes formulações de salame: A = amostras.....	105
	B = vetores dos atributos.....	106
Figura 13.	Confirmação das amostras por PCR.....	110
Figura 14.	Dendrograma ilustrando a correlação entre os diferentes geis de eletroforese de gradiente desnaturante e os perfis obtidos para as amostras de cada compartimento do colon.....	115
Figura 15.	Índice de Shannon e dominância.....	116
Figura 16.	Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (Mmol) produzidos nos reatores 3, 4 e 5, que simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon no simulador do ecossistema microbiano humano, durante as três fases do período experimental.....	119

Anexos

Anexo 1.	Modelo de ficha para escala hedônica estruturada mista de nove pontos.....	147
Anexo 2.	Termo de consentimento livre esclarecido – Teste de aceitação.....	148
Anexo 3.	Modelo de ficha de intenção de compra.....	149
Anexo 4.	Termo de consentimento livre esclarecido – ADQ.....	150
Anexo 5.	Termo de consentimento livre esclarecido – SEMH.....	151
Anexos 6 e 7.	Galeria do sistema API 20-Strep e API 60 CH utilizado para a identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp. presentes nas diferentes formulações de salames probióticos	152
Anexo 8.	Modelo de ficha utilizado no levantamento dos termos descritores	152
Anexo 9.	Modelo de ficha utilizado na análise das amostras na ADQ	153

Sumário

1.	Introdução.....	17
2.	Revisão Bibliográfica.....	20
2.1	Conservação e Fermentação.....	20
2.2	Microrganismos probióticos.....	22
2.3	Embutidos cárneos.....	24
2.3.1	Embutidos cárneos fermentados.....	25
2.4	Salame.....	27
2.5	Utilização de óleos vegetais em produtos cárneos.....	30
2.6	Segurança do Salame.....	32
2.7	Utilização de Culturas Probióticas na Produção de Salames.....	34
3.	Objetivos.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4.	Material e Métodos.....	38
4.1	Material.....	38
4.2	Obtenção do Produto Carne Fermentado.....	38
4.3	Métodos.....	43
4.3.1	Sensibilidade das culturas probióticas frente à concentração de cloreto de sódio (NaCl) e nitrito de sódio.....	43
4.3.2	Produção de substâncias antimicrobianas/bacteriocinas.....	43
4.3.3	Análises físico-químicas.....	44
4.3.4	Análises Microbiológicas.....	47
4.3.5	Análise Sensorial.....	48
4.3.6	Análise de ácidos graxos de cadeia curta e amônia.....	52
4.3.7	Análises microbiológicas.....	53
4.3.7.1	Determinação da sobrevivência gastrintestinal de <i>Enterococcus faecium</i>	53
4.3.8	PCR <i>Enterococcus faecium</i>	54
4.3.9	DGGE (Eletroforese em gel com gradiente desnaturante) e análise de agrupamentos (dendogramas).....	54
5.	Resultados e Discussão.....	57
5.1	Sensibilidade das culturas probióticas frente ao cloreto de sódio (NaCl) e ao nitrito de sódio.....	57
5.2	Produção de substâncias antimicrobianas/bacteriocinas.....	58
5.3	Elaboração dos embutidos cárneos fermentados com teor reduzido de nitrito, nitrato e gordura, fermentado com culturas iniciadoras probióticas.....	59
5.4	Caracterização dos produtos.....	60
5.5	Análises microbiológicas.....	86
5.6	Análise sensorial.....	93
5.7	Sobrevivência do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 às condições do estômago e do duodeno e análises microbiológicas.....	109
5.8	Análise da composição da microbiota intestinal.....	110
5.9	Análises de ácidos graxos de cadeia curta e amônia.....	116

6.	Conclusões.....	121
7.	Referências Bibliográficas.....	123
	Artigo submetido – Journal of Food Science - Safety of a low-fat fermented sausage produced with <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 and <i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL1014 probiotic strains.....	154

1. Introdução

Atualmente, a indústria alimentícia se depara com um dilema: a busca por alimentos seguros, que sejam ao mesmo tempo, minimamente processados e livres de aditivos alimentares. Essa tendência de mercado tem impulsionado a aplicação de formas alternativas para a conservação de alimentos.

A fermentação é utilizada há milênios como técnica de preservação sendo considerada uma forma efetiva de aumentar a vida de prateleira de alimentos e bebidas por meio da ação de microrganismos e de seus metabólitos (ROSS; MORGAN; HILL, 2002).

As culturas iniciadoras tradicionais, utilizadas em processos fermentativos, produzem vários compostos (ácidos orgânicos, dióxido de carbono, peróxido de nitrogênio, diacetil e álcool), que atuam na conservação e influenciam a qualidade sensorial do alimento (LEROY; DE VUYST, 2004). A substituição total ou parcial das culturas iniciadoras tradicionais por outras probióticas pode contribuir para a segurança do produto final e oferecer vantagens sensoriais, tecnológicas, nutricionais e benefícios à saúde, representando uma alternativa atrativa para a indústria alimentícia (MUTHUKUMARASAMY; HOLLEY, 2007; PIDCOCK; HEARD; HENRIKSON, 2002).

Os microrganismos capazes de conferir benefícios à saúde, conhecidos como probióticos, são tradicionalmente veiculados em produtos lácteos incluindo iogurtes, leites fermentados e sobremesas lácteas. Na indústria cárnea, a utilização de probióticos se mostra mais promissora em produtos embutidos fermentados como o salame, que são processados e consumidos sem aquecimento (AMMOR; MAYO, 2007; TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003).

Apesar de ser um produto apreciado pelos consumidores, o consumo de salame tem sido criticado por nutricionistas devido seu elevado teor de gordura e de sal, presença de nitrito residual e de compostos potencialmente tóxicos, como as aminas bioativas (espermina, espermidina, putrescina, cadaverina, tiramina, feniletilamina, histamina e triptamina) (COLORETTI et al., 2008).

Os produtos cárneos processados possuem alto teor de gordura (20-30%), que contribui para as características sensoriais típicas dos mesmos. Entretanto, a gordura presente em produtos carneos processados é predominantemente saturada e está associada a problemas de saúde como arteriosclerose, câncer de cólon e obesidade. Esse fato tem estimulado o desenvolvimento e o consumo de derivados cárneos mais saudáveis, com substituição e/ou redução no teor de gordura animal (CANDOGAN; KOLSARICI, 2003).

A utilização de nitrato e nitrito de sódio e/ou potássio no processamento de embutidos cárneos é importante para a conservação e qualidade sensorial dos produtos. Por outro lado, a adição de tais substâncias é discutível devido ao seu efeito cumulativo no organismo e potenciais efeitos negativos à saúde, podendo levar à formação endógena de compostos que apresentam efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (MARTINS; MIDIO, 2000).

Dessa forma, a redução de gordura e de sais de cura, bem como a utilização de culturas funcionais com características probióticas, poderia resultar na obtenção de um salame seguro e mais interessante do ponto de vista nutricional, contribuindo para o reposicionamento de mercado desse produto.

A seleção do microrganismo probiótico é essencial para que os efeitos desejáveis sejam observados. Considerando a elevada prevalência das doenças cardiovasculares e a importância dos parâmetros lipídicos na etiologia dessa patologia, muitos pesquisadores têm se dedicado à identificação de cepas com potencial hipolipemiante. Rossi et al. (1994) estudaram 18 cepas bacterianas quanto à capacidade de remoção do colesterol *in vitro*, sendo os melhores resultados obtidos com *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 e *Enterococcus faecium* CRL183. Outros estudos indicam que a cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 apresenta capacidade de modulação da microbiota intestinal (BEDANI, 2008; CAVALLINI et al, 2011) e redução do risco de desenvolvimento de câncer de cólon (SIVIERI et al, 2008) e mama (KINOUCI, 2006). Até o

presente momento, tais cepas e suas propriedades benéficas, foram avaliadas somente em produtos à base de extrato aquoso de soja (CAVALLINI et al, 2009; ROSSI et al, 2000, 2003, 2008).

Nesse sentido, mostrou-se oportuna a utilização de bactérias lácticas com propriedade hipolipemiante na conservação de um produto cárneo fermentado, similar ao salame, com teores reduzidos de gordura e de nitrito e nitrato e que apresente características tecnológicas e sensoriais adequadas, aliadas a propriedades de saúde adicionais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Conservação e Fermentação

A fermentação é uma das mais antigas técnicas de preservação conhecidas, dependente da atividade de microrganismos. O processo de fermentação envolve a metabolização de carboidratos para gerar substâncias que podem inibir o crescimento e a sobrevivência de microrganismos indesejáveis em alimentos e bebidas. Em adição, podem ser produzidos metabólitos que afetam a qualidade sensorial do alimento (diacetil e acetaldeído) e promovem a saúde (vitaminas e peptídeos bioativos) (ROSS; MORGAN; HILL, 2002; VISESSANGUAN et al., 2004).

Os primeiros alimentos fermentados foram obtidos por fermentação espontânea, em decorrência do desenvolvimento da microbiota naturalmente presente na matéria-prima (ROSS, MORGAN, HILL, 2002). No entanto, a fabricação atual de produtos fermentados envolve a utilização de culturas iniciadoras específicas, previamente selecionadas de acordo com a habilidade de conferir segurança, aumentar a vida-de-prateleira e melhorar a qualidade do produto final (LEROY; DE VUYST, 2004).

As bactérias ácido lácticas – pertencentes aos gêneros *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Pediococcus* spp. - são as mais utilizadas no processamento de alimentos e bebidas, devido a sua habilidade de reduzir o pH do meio e produzir compostos antimicrobianos, além de alterar positivamente as características sensoriais do alimento (VERLUYTEN; MESSENS; DE VUYST, 2003).

O efeito inibitório das bactérias lácticas é atribuído à ação conjunta de vários metabólitos antimicrobianos produzidos durante o processo fermentativo. Entre tais metabólitos, merecem destaque os ácidos orgânicos – lático, acético e propiônico – que causam acidificação do meio, interferem na manutenção do potencial de membrana e reduzem o pH intracelular, inibindo, assim, o desenvolvimento de muitos microrganismos patogênicos e esporulados (ADAMS; NICOLAIDES,

1997; ROSS; MORGAN; HILL, 2002). Os demais compostos com atividade antibacteriana produzidos durante a fermentação incluem dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil, antibióticos e bacteriocinas (ROSS; MORGAN; HILL, 2002).

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas de baixo peso molecular que exibem atividade antibacteriana restrita a bactérias Gram-positivas. Tais substâncias podem ser adicionadas na forma de preparações concentradas ou produzidas no próprio alimento pela ação de bactérias lácticas específicas (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). As únicas bacteriocinas disponíveis comercialmente são a nisina produzida por *Lactococcus lactis* (NisaplinTM) e a pediocina PA-1 produzida por *Pediococcus acidilactici* (ALTATM 2431). A nisina inibe o crescimento de patógenos como *Listeria monocytogenes* e de microrganismos produtores de esporos, especialmente os pertencentes aos gêneros *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp., sendo usada em alimentos enlatados, queijos e produtos lácteos, na forma de concentrado em pó (DEEGAN et al., 2006). A utilização de bactérias produtoras de bacteriocinas, como uma opção à adição de nitrato de potássio, tem se mostrado eficaz na prevenção da contaminação do queijo por *Clostridium* spp., e representa uma forma de substituir aditivos químicos por compostos naturais (GUINANE et al., 2005; THOMAS; CLARKSON; DELVES-BROUGHTON, 2000).

Recentemente, o uso de culturas funcionais na fermentação de alimentos tem sido estimulado, uma vez que além de fornecer a nutrição básica, podem promover benefícios à saúde (SANDERS, 1998). Essas culturas oferecem vantagens em relação às culturas tradicionais e representam uma forma de aperfeiçoar o processo fermentativo e produzir produtos mais seguros e saudáveis. Os microrganismos funcionais exibem características específicas como: produção de compostos antimicrobianos, redução de substâncias tóxicas e benefícios à saúde do consumidor (LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006). Entre as culturas funcionais, as que exibem propriedades probióticas apresentam grande interesse comercial, pois atendem as expectativas de consumidores interessados na relação entre alimentos e saúde.

2.2 Microrganismos Probióticos

A legislação brasileira define probióticos como: “Microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (ANVISA, 2002). Esta definição é semelhante à aceita mundialmente, segundo a qual “probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em doses apropriadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). Segundo as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os microrganismos probióticos devem estar presentes na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na porção diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008).

No Brasil, a ANVISA permite o uso da alegação “O (espécie do microrganismo probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis”, para produtos que contenham *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei rhammosus*, *Lactobacillus casei defens*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios: gênero ao qual pertence, ser de origem humana, estabilidade frente ao ácido e à bile, capacidade de aderir à mucosa intestinal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano e capacidade de produzir compostos antimicrobianos. Outro critério fundamental é a segurança para o consumo humano, incluindo o histórico de não patogenicidade e a ausência de genes determinantes de resistência a antibióticos (SAARELA et al., 2000; STANTON et al., 2003).

Os efeitos benéficos decorrentes do consumo de microrganismos probióticos incluem: redução dos sintomas da má absorção da lactose e da incidência de diarréias e de tumores, modulação do sistema imune e do perfil lipídico (ROSSI, 2001).

O controle das dislipidemias é essencial para a redução da morbi-mortalidade da população em função de doenças cardiovasculares (WHO, 2003a). Os mecanismos pelos quais os probióticos afetam as concentrações de colesterol envolvem: assimilação do colesterol pelas bactérias; incorporação do colesterol à parede celular bacteriana; desconjugação enzimática dos sais biliares e alteração do metabolismo lipídico pela atuação dos ácidos graxos de cadeia curta (PEREIRA; GIBSON, 2002; STROMPFOVÁ, et al., 2006; ZHAO; YANG, 2005).

Trabalho realizado em 1994, envolvendo pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP–Araraquara) e do Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA–Argentina), concluiu que as cepas *E. faecium* CRL183 e *L. acidophilus* CRL 1014 são capazes de remover 53,85% e 54,0%, respectivamente, do colesterol adicionado ao meio de cultura (ROSSI et al., 1994). Apoiando-se nesses resultados, foi desenvolvida uma bebida fermentada de soja, utilizando como microrganismos iniciadores um cultivo misto de *E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* 416 (ROSSI et al., 2000). O produto obtido exibiu efeito hipolipemiante em coelhos (colesterol total= - 18,4%; HDL-C= + 17,8%), em ratos (Colesterol não-HDL = -23,2%) e em homens normocolesterolêmicos (HDL-C= +10%) (ROSSI et al. 2000; ROSSI et al., 2003; ROSSI et al., 2008). Recentemente, o mesmo produto suplementado com isoflavonas foi capaz de reduzir significativamente ($p<0,05$) os níveis basais de colesterol total (13,8%) e de colesterol não-HDL (14,7%) de voluntários com hipercolesterolemia moderada, de inibir a formação de lesões ateroscleróticas na aorta de coelhos com hipercolesterolemia induzida e modular benéficamente a microbiota desses animais (CAVALLINI, 2009, CAVALLINI et al., 2009a, 2009b, 2011). A cepa de *Enterococcus faecium* CRL 183 exibe ainda boa resistência gastrointestinal e ausência de fatores de virulência (SAAVEDRA et al., 2003).

Lactobacillus acidophilus CRL 1014 foi utilizado com sucesso na elaboração de um hambúrguer de frango fermentado, sem adição de sais de cura, demonstrando que essa cepa é capaz de se desenvolver em produtos cárneos (BOMDESPACHO et al., 2011).

2.3 Embutidos cárneos

Evidências indicam que os produtos animais têm sido utilizados pelos seres humanos como fonte de alimentos há milhares de anos. Hoje, o grande apelo sensorial e a saciedade proporcionada pelo consumo de carnes e seus derivados, faz com que esses produtos tenham destaque nas dietas do mundo todo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A carne *in natura* se deteriora rapidamente, dessa forma a industrialização visa aumentar sua vida útil, além de utilizar partes do animal de difícil comercialização no estrado cru (ORDOÑEZ et al, 2005; TERRA, 2006).

São considerados produtos cárneos aqueles preparados, total ou parcialmente, com carnes, miúdos ou gorduras e, eventualmente, com adição de ingredientes de origem vegetal ou animal, como condimentos, especiarias e aditivos (ORDOÑEZ et al, 2005). A associação destes ingredientes, com a aplicação de tratamentos físicos e térmicos, promove modificações físico-químicas, aumentando a vida útil, desenvolvendo sabores e agregando valor (TERRA, 1998).

A redução da atividade de água (A_w), combinada com a redução do pH, pode ser considerada uma das mais antigas tecnologias de preservação de carnes. A salga, obtida por imersão em salmoura ou pela cobertura da superfície da carne por sal, e/ou a secagem são técnicas que promovem a redução da A_w (VANDENDRIESSCHE, 2008).

A palavra embutido deriva do latim *salsus* que significa salgado ou carne conservada pela salga. A elaboração de embutidos se iniciou com um simples processo de salga e secagem, para conservar a carne fresca que não podia ser consumida imediatamente. A adição de especiarias e condimentos melhora o perfil sensorial dos produtos, que eram manuseados dentro de invólucros naturais provenientes do trato intestinal de animais (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Antes a elaboração de embutidos era considerada uma arte e hoje é uma ciência altamente sofisticada. Todos os dias surgem novas tecnologias desde o processamento, desenvolvimento de

equipamentos até a forma de apresentação dos produtos, tornando esta área uma das mais dinâmicas na indústria cárnea (PRICE; SCHWEIGERT, 1994).

Embutidos como o salame, crus, curados ou fermentados fazem parte da tendência atual de consumo da população, por serem prontos para o consumo, de fácil conservação, uso variado na culinária, além do caráter nutritivo (MACEDO, 2005).

2.3.1 Embutidos Cárneos Fermentados

A carne apresenta alta perecibilidade devido ao seu elevado teor de proteína e de água, necessitando de técnicas adequadas de preservação para ampliar a sua vida útil. Os processos de secagem, fermentação, defumação e salga são utilizados há muitos anos para a conservação da carne (BERKEL; BOOGAARD; HEIJNEN, 2005; MACEDO, 2005). Os embutidos cárneos fermentados são resultantes da fermentação láctica da carne crua triturada e salgada, adicionada de gordura animal e especiarias, e apresentam sabor forte e picante característico. Esses produtos exibem elevada estabilidade quando comparados a outros produtos cárneos em função de diversos fatores que atuam como obstáculos ao desenvolvimento microbiano (FROSI, 2002; MACEDO, 2005).

A fermentação cárnea é um processo dinâmico caracterizado por contínuas alterações bioquímicas, biofísicas e microbiológicas e empregado há muitos anos para a conservação da carne. Ultimamente tem-se tentado conhecer, monitorar e melhorar o processo, visando à obtenção de produtos de qualidade superior (MACEDO, 2005).

Existe uma grande variedade de produtos cárneos fermentados que diferem em função da matéria-prima e ingredientes utilizados, tamanho das partículas, tempo de fermentação e perfil sensorial (LÜCKE, 2000). São preparados a partir de matéria-prima crua ou aquecida, os quais adquirem suas propriedades características através de um processo no qual os microrganismos estão envolvidos. Em certos casos, as enzimas endógenas da matéria-prima desempenham função decisiva na obtenção de tais produtos (TERRA; FRIES; TERRA, 2004).

A preservação das carnes por fermentação depende da interação de inúmeros fatores ambientais e microbiológicos, incluindo pH, atividade de água, potencial redox, presença de conservantes e a competição da microbiota presente na carne (CAMPBELL-PLATT; COOK, 1995).

Tradicionalmente, a produção de embutidos fermentados dependia dos microrganismos resultantes da contaminação das matérias-primas. Durante a fabricação, o contato da matéria-prima com diferentes microrganismos, presentes nos instrumentos e instalações, impossibilitava a manutenção da qualidade dos produtos fermentados. Assim, era impossível a produção, em lugares diferentes, de produtos com a mesma qualidade (TERRA, 2006).

Após 1961, a obtenção de produtos fermentados com maior qualidade tornou-se possível devido à utilização de culturas puras de microrganismos. A utilização de culturas iniciadoras específicas (“starters”) tem como objetivos melhorar a segurança do produto frente aos patógenos, aumentar a vida útil do produto devido à inibição de microrganismos deteriorantes e obter produtos com propriedades sensoriais distintas (LÜCKE, 2000).

Os embutidos cárneos fermentados são aqueles que sofrem uma rápida fermentação com posterior desidratação parcial, embutidos em envoltórios naturais ou artificiais, defumados ou não. Esses produtos dispensam refrigeração e possuem grande estabilidade quando comparados com outros produtos cárneos em função da combinação de diversos fatores que atuam como obstáculos ao crescimento microbiano indesejável (MACEDO, 2005).

Os embutidos podem ser classificados em secos e semi-secos. Os embutidos semi-secos possuem sabor mais picante, textura mais branda e menos rugosidade, contendo aproximadamente, 50% de água, enquanto os secos possuem 35% de umidade permanecendo em maturação por 10 a 100 dias (PRÄNDL et al, 1994). A formulação das carnes, o tamanho das partículas, a intensidade do sabor de defumado, a temperatura de estocagem e o tipo de invólucro utilizado são variáveis que contribuem para a existência de uma ampla variedade de embutidos (PRICE; SCHWEIGERT, 1994). O sabor picante e forte dos produtos semi-secos resulta da presença de ácidos orgânicos

predominantes nos produtos comercializados com menos de duas semanas de maturação, pois a partir desse período iniciam-se processos de oxidação desses ácidos, com consequente redução do gosto ácido à medida que se prolonga a maturação (LÜCKE, 2000).

Sal, nitrito, pH e controle da temperatura de fermentação são fatores responsáveis pela segurança e qualidade dos produtos cárneos fermentados (RUUSUNEN; PUOLANNE, 2005). Os derivados cárneos fermentados dispensam refrigeração e possuem grande estabilidade quando comparados com outros produtos cárneos (ARNAU et al, 2007).

2.4 Salame

O salame é classificado como um produto fermentado, cru, seco ou semi-seco e não emulsionado, obtido de carne suína ou de uma mistura de carne suína e bovina, adicionado de gordura suína (toucinho), açúcares, sal, nitrito e/ou nitrato, ascorbato e condimentos. O produto é embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado (BRASIL, 2000). Características como: calibre, grau de moagem dos ingredientes, condimentos, período de maturação e defumação ou não, variam de acordo com o tipo de salame (CACCIOPPOLI et al., 2006).

O salame teve a sua fabricação iniciada no sul do Brasil, com a imigração italiana. A estabilidade desses produtos fermentados dependia da fermentação natural da matéria-prima, o que reduzia os valores de pH do produto, impedindo que ocorresse o crescimento de microrganismos deteriorantes (TERRA, 2004).

Internacionalmente, os salames são classificados em dois grandes grupos de acordo com a tecnologia de fabricação e o pH final do produto. Os salames do norte da Europa são elaborados com carne bovina e suína, submetidos à fermentação de curta duração e rápida redução de pH. Os salames do sul da Europa ou Mediterrâneo apresentam em sua formulação, predominantemente, carne suína, a fermentação é longa, os valores de pH são sempre superiores a 5,0, características que, juntamente

com a adição de especiarias, conferem ao produto aroma e sabor diferenciados (TALON; LEROY; LEBERT, 2007). O salame tipo italiano fabricado no Brasil enquadra-se no segundo grupo, pois é, predominantemente obtido a partir de carne suína, maturado por um período aproximado de 30 dias, apresentando aroma e sabor suaves e pH em torno de 5,4 (MACEDO, 2005; TERRA, 2006).

No Brasil, a produção de salames se concentra na região sul, representando cerca de 3% dos produtos cárneos industrializados no país. Os tipos mais conhecidos são italiano, milano, hamburguês, friolano, calabrés, alemão, salaminho e napolitano e se assemelham aos salames produzidos no sul da Europa (TERRA, 1998).

A fabricação do salame envolve, basicamente, duas etapas distintas: a) etapa inicial, onde ocorre a homogeneização das matérias-primas e demais ingredientes e a fermentação com conseqüente acidificação e desenvolvimento de características sensoriais, e b) etapa final, caracterizada pela desidratação do embutido, que contribui para a segurança e o perfil sensorial do produto (TERRA, 2003).

Em geral, as bactérias utilizadas na fermentação do salame são heterofermentativas facultativas, que produzem ácido láctico a partir de hexoses e provocam redução do pH a valores de aproximadamente 5,0, durante os primeiros dias de processamento. Devido à insuficiência de açúcares na carne, a adição de glicose ou lactose se faz necessária para garantir quantidade suficiente de substrato para a fermentação. Entre as bactérias lácticas freqüentemente empregadas como culturas iniciadoras em produtos cárneos destacam-se: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus* (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003).

A massa cárnea, embutida em envoltórios com diâmetros variáveis, permanece em câmaras de fermentação e maturação durante várias semanas (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003). Quando o pH da mistura atinge o ponto isoelétrico da carne, a capacidade de retenção de água é reduzida, favorecendo a secagem e a redução de peso do produto. Durante a

secagem, os embutidos perdem de 30 a 40% do seu peso inicial, sendo que a perda de água deve ser gradual para evitar o ressecamento excessivo da casca (GARCIA; GALEAZZI; SOBRAL, 2000; LÜCKE e HECHELMANN, 1987).

A defumação é uma etapa opcional que auxilia no desenvolvimento de sabor e previne o desenvolvimento de microrganismos na superfície do produto (LÜCKE, 1986).

Os fatores que contribuem para as características sensoriais do salame incluem: tipo de matéria-prima, condimentos, cultura iniciadora, processo de defumação e secagem e adição de sais de cura. O ácido láctico é o principal componente de sabor do salame, juntamente com os produtos resultantes da ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas. Reações químicas e enzimáticas que ocorrem durante a fermentação e maturação do salame degradam proteínas em aminoácidos e lipídios em ácidos graxos. Os aminoácidos são descarboxilados em aminas bioativas ou compostos aromáticos e os ácidos graxos oxidados a aldeídos, álcoois e cetonas - compostos voláteis que contribuem para o sabor e aroma característicos do salame (LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006).

As aminas bioativas, formadas através da descarboxilação de aminoácidos, estão relacionadas a efeitos adversos à saúde do consumidor (SILLA SANTOS, 1996). Essas substâncias são bases orgânicas alifáticas (espermina, espermidina, putrescina e cadaverina), aromáticas (tiramina e feniletillamina) ou heterocíclicas (histamina e triptamina), encontradas em muitos alimentos e consideradas essenciais para algumas funções fisiológicas. No entanto, quando consumidas em grandes quantidades, as aminas bioativas podem causar dores de cabeça, hipotensão, hipertensão, náusea, palpitação, intoxicação renal e hemorragia cerebral (SHALABY, 1996). Nos embutidos fermentados, as aminas bioativas ocorrem em função da presença de aminoácidos, acumulados durante a etapa de maturação, e de grupos de microrganismos com atividade aminoácido-descarboxilase, que são introduzidos no produto via culturas iniciadoras ou fazem parte da microbiota natural da carne (BOVER-CID; HOLZAPFEL, 2000). O uso de culturas iniciadoras

específicas, com capacidade de inibir microrganismos com atividade aminoácido-descarboxilase, tem sido indicado como uma forma de reduzir os níveis de aminas bioativas em salames (COLORETTI et al., 2008; GONZALEZ-FERNANDEZ et al., 2003).

O salame apresenta uma desvantagem do ponto de vista nutricional, pois apresenta elevado teor de gordura animal (máximo de 35%, BRASIL, 2000), constituindo um problema para consumidores preocupados com a saúde. Por outro lado, a gordura contribui para o sabor, textura e aparência de embutidos cárneos e a redução desse ingrediente pode alterar as características sensoriais e a aceitação do produto (KEETON, 1994; MUGUERZA et al., 2002).

Nesse sentido, estudos foram conduzidos com o objetivo de reduzir a concentração de gordura animal no salame ou substituí-la por outra fonte mais saudável.

2.5 Utilização de óleos vegetais em produtos cárneos

Alimentos cárneos funcionais vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de minimizar os impactos negativos na saúde humana devido ao consumo de gordura de origem animal (ARIHARA, 2006). O desenvolvimento de tais alimentos deve considerar a substituição da gordura animal por fontes lipídicas de origem vegetal e marinha, capazes de fornecer benefícios nutricionais, com menor proporção de ácidos graxos saturados e maior quantidade de ácidos graxos polinsaturados e monoinsaturados e, quando possível, livres de colesterol (JIMÈNEZ-COLMENERO, 2007). Algumas características dos óleos vegetais devem ser consideradas durante a substituição da gordura suína, tais como cor, consistência, estabilidade oxidativa, sabor, índice de instaurações, ponto de fusão e composição de ácidos graxos (OSPINA-E et al, 2010).

Os óleos vegetais e marinhos, geralmente líquidos à temperatura ambiente, têm sido utilizados na elaboração de produtos cárneos com perfis lipídicos mais saudáveis. Entre os derivados cárneos que tiveram reformulação, estão os modelos de sistemas de emulsão (CHOI et al, 2010, CHOI et al, 2009, YOUSEFF; BARBUT, 2009; ZORBA; KURT, 2008), os produtos cárneos

cozidos (BLOUKAS; PANERAS, 1993; TAN et al, 2006; VURAL; JAVIDIPOUR; OZBAS, 2004; YUNES, 2010) e os produtos cárneos fermentados (BLOUKAS; PANERAS; FOURNITZIS, 1997; MUGUERZA et al, 2001; MUGUERZA; ANSORENA; ASTIASARÁN, 2003; SEVERINI; DE PILLI; BAIANO, 2003; VALENCIA; ANSORENA; ASTIASARÁN, 2006).

A substituição de 60% a 100% da gordura suína por óleo de palma, óleo de semente de algodão e azeite de oliva em salsichas resultou em alterações positivas no perfil de ácidos graxos, aumentando a relação de ácidos graxos polinsaturados/saturados e monoinsaturados/saturados, sem modificações significativas na textura, coloração e aspectos sensoriais dos produtos (VURAL; JAVIDIPOUR, 2002).

Alguns produtos apresentam dificuldade na estabilização do óleo adicionado na forma líquida, necessitando de uma etapa de pré-emulsificação através da utilização de um agente emulsificante, normalmente uma proteína não cárnea. A pré-emulsificação do óleo com proteínas não cárneas, especialmente a proteína isolada de soja, reduz as chances de separação do óleo da estrutura do produto, pois este fica imobilizado na estrutura proteica. Além disso, a emulsão do óleo em água é facilmente dispersa em sistemas cárneos, já que apresentam quantidades significativas de água (DJORDJEVIC; MCCLEMENTS; DECKER, 2004; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2007;).

A pré-emulsificação do óleo vegetal normalmente segue as propostas de Hoogenkamp (1989a) e Hoogenkamp (1989b). Nesta metodologia, faz-se uma mistura de 8 partes de água quente (50-60°C) com uma parte de proteína isolada de soja ou caseinato de sódio por 2 minutos. A seguir, adicionam-se 10 partes de óleo e mistura-se por mais 3 minutos. Na elaboração de um produto fermentado turco, Bishop; Olson; Knipe (1993) usaram uma proporção de 8:8:1 de óleo de milho, água e caseinato de sódio, enquanto Kayaardi e Gök (2003) utilizaram uma razão de 5:1:5 de água, proteína isolada de soja e azeite de oliva.

A utilização de óleo de oliva como substituto parcial da gordura animal tem se mostrado eficaz na obtenção de embutidos cárneos com baixo teor de gordura. Severini; Pilli; Baiano (2003)

observaram que a substituição de 33,5% da gordura de porco pelo óleo de oliva (5%) possibilitou a obtenção de um salame com características sensoriais semelhantes as do salame tradicional. Murgueza et al. (2002) verificaram que a adição de óleo de oliva em substituição à gordura de porco (20%), resultou em um embutido com características de sabor e aroma desejáveis, porém, a aparência do produto foi considerada inaceitável devido ao aspecto enrugado e endurecido da casca. Outros autores propuseram a associação de óleo de oliva e carragena e a utilização de filmes de permeabilidade média para a embalagem a vácuo, como uma forma de minimizar os efeitos da redução de gordura animal (CIERACH; MODZELEWSKA-KAPITULA.; SZACILO, 2009; KOUTSOPOULOS; KOUTSIMANIS; BLOUKAS, 2008).

2.6 Segurança do Salame

A segurança do salame é decorrente da presença de sais de cura, produção de compostos antimicrobianos e redução do pH e da atividade de água durante a fermentação.

O nitrito, além de estar envolvido no desenvolvimento de cor e sabor do salame, é particularmente importante no início do processo de fermentação para inibir o crescimento de microrganismos, como *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp., uma vez que o pH da mistura ainda não foi suficientemente reduzido. O nitrito, na forma de ácido nitroso (HNO_2), ultrapassa a barreira da parede celular bacteriana e altera o seu metabolismo, impedindo assim o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis. Nitrato pode ser utilizado como uma forma de estoque de nitrito, pois alguns microrganismos são capazes de reduzir nitrato a nitrito, durante a produção do salame (PIERSON; SMOOTH, 1987; TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003).

De acordo com as recomendações da ANVISA, o nitrito pode ser adicionado ao salame com a função de conservante, na forma de nitrito de sódio ou de potássio (150 ppm de nitrito residual) ou como nitrato de sódio ou de potássio (300 ppm de nitrito residual) (BRASIL, 1998). O ácido nitroso, derivado do nitrito, é um precursor do anidrido nitroso, que reage com aminoácidos e aminas

produzindo as nitrosaminas, que provocam estresse oxidativo, ativação de citocinas pró-inflamatórias e degeneração e morte celular (DE LA MONTE et al., 2009; SHAHIDI; PEGG; SEN, 1994). A exposição crônica a pequenas doses de nitrito, nitrato e nitrosaminas vem sendo associada ao desenvolvimento de câncer e aumento da prevalência de doenças como Alzheimer, Parkinson, esteatose hepática não alcoólica e diabetes tipo 2 (DE LA MONTE et al., 2009).

Durante a etapa de fermentação, as culturas iniciadoras produzem quantidades elevadas de ácido lático, reduzindo o pH do salame e resultando em alteração da homeostase e inibição do crescimento de microrganismos patógenos e esporulados (LEISTNER, 2000).

A barreira para o crescimento de microrganismos indesejáveis no salame é a sua baixa atividade de água. A adição de sal reduz a atividade de água inicial da mistura e a secagem, realizada em câmaras de maturação, com temperatura e umidade relativa do ar controladas, resulta em um produto final com atividade de água inferior a 0,90, condição desfavorável ao desenvolvimento de microrganismos (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTLA-SANDHOLM, 2003).

Bactérias da família enterobacteriaceae, como *Salmonella* spp., são inibidas pela redução do pH e do nível de oxigênio, pela baixa atividade de água e pelo nitrito. *Staphylococcus aureus* é inibido, competitivamente, por bactérias ácido lácticas. A germinação de esporos de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. é controlado pelo baixo pH e pela redução da atividade de água. Entretanto, o controle de bactérias patogênicas, resistentes a condições de baixo pH, consiste em um problema na produção de produtos cárneos crus fermentados (GLASS; ZHAO; DOYLE, 1992).

As características de processamento e a composição dos salames não são suficientes para inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enterohemorrágica (GLASS; ZHAO; DOYLE, 1992). Uma alternativa para reduzir o risco de contaminação do salame por microrganismos resistentes é a utilização de culturas iniciadoras funcionais, com capacidade de produzir bacteriocinas e outros compostos antibacterianos (ALAKOMI et al., 2000; DICKS; MELLET; HOFFMAN, 2004; MUTHUKUMARASAMY; HOLLEY, 2007).

2.7 Utilização de Culturas Probióticas na Produção de Salames

O uso de culturas probióticas é bastante difundido em produtos lácteos, sendo escassa a sua aplicação na indústria cárnea. A substituição total ou parcial de culturas tradicionais por outras probióticas na produção de salames apresenta vantagens e desvantagens. Em geral, os salames são processados e consumidos sem aquecimento, facilitando a manutenção da viabilidade do microrganismo probiótico. Adicionalmente, estudos indicam que as características tamponantes da carne e a gordura do salame protegem os microrganismos probióticos das condições adversas do trato gastrointestinal. Por outro lado, a presença dos sais de cura e a baixa atividade de água podem reduzir a viabilidade dos microrganismos (ERKKILÄ; PETÄJÄ; 2000; LÜCKE, 2000).

Em 1998, um produtor alemão desenvolveu o primeiro salame probiótico comercial, contendo três bactérias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp.). No mesmo ano, consumidores japoneses tiveram acesso a novos produtos cárneos probióticos, contendo *Lactobacillus rhamnosus* FERM P-15120 (SAMESHIMA et al., 1998).

O microrganismo probiótico utilizado como cultura iniciadora na produção de salames deve ser capaz de se desenvolver em produtos cárneos, produzir ácidos orgânicos, sobreviver ao processo de secagem e ao período de armazenamento, sendo detectável em quantidades elevadas no produto final (ERKKILÄ; PETÄJÄ; 2000).

A capacidade de produzir aminas bioativas também deve ser considerada na seleção das culturas iniciadoras probióticas, uma vez que a produção desses compostos em produtos cárneos fermentados está associada a algumas espécies de *Lactobacillus* spp., enquanto outras espécies são descritas como não produtoras de aminas (BOVER-CID; HOLZAPFEL, 1999; FADDA; VIGNOLO; VOLIVER, 2001; PIRCHER; FRIEDRICH; PAULSEN, 2007).

O salame probiótico deve apresentar ainda características tecnológicas e sensoriais compatíveis com as dos salames tradicionais, garantindo a sua aceitação pelo mercado consumidor (ERKKILÄ et al., 2001; DE VUYST; FALONE; LEROY, 2008; MUTHUKUMARASAMY;

HOLEY, 2006). As culturas probióticas podem exibir outras características desejáveis como capacidade de inativação de patógenos e produção de compostos antimicrobianos.

Muthukumarasamy e Holey (2007) concluíram que a utilização de *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 e *Bifidobacterium longum* ATCC15708 como culturas iniciadoras reduz a população de *Escherichia coli* O157:H7 durante a produção de salame. Em outro estudo, cepas de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* FERM P-15121 e uma cultura comercial de *Lactobacillus sakei* inibiram a multiplicação e a produção de enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (SAMESHIMA et al, 1998). Callewaert; Hugas; De Vuyst (2000); Hugas et al. (1995) verificaram que cepas probióticas de *Lactobacillus casei* e *Enterococcus faecium* foram capazes de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* em salames através da produção de bacteriocinas. Outras substâncias antimicrobianas, como a reuterina e reuteriicina, produzidas por cepas de *Lactobacillus reuteri*, e compostos de baixo peso molecular, produzidos por *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*, também foram eficazes na inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (PIDCOCK; HEARD; HENRIKSON, 2002; ROSS; MORGAN; HILL, 2002).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da utilização de bactérias láticas probióticas com propriedade hipolipemiante nas características tecnológicas, sensoriais e de segurança de um embutido cárneo fermentado, similar ao salame, com teor reduzido de gordura e de sais de cura. Adicionalmente, foi realizado um estudo *in vitro* para determinar a resistência gastrointestinal dos microrganismos probióticos e verificação do efeito do produto probiótico na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e modulação da microbiota intestinal.

3.2 Objetivos específicos

Primeira Etapa: Estudo no Produto

- Avaliar a capacidade das culturas probióticas (*Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL1014) de sobreviver às concentrações de sais de cura utilizadas em produtos cárneos fermentados.
- Analisar a capacidade de produção de bacteriocinas *in vitro* pelas culturas probióticas.
- Elaborar um embutido cárneo fermentado com teor reduzido de nitrito, nitrato e gordura, fermentado com culturas iniciadoras probióticas (cepas com propriedade hipolipemiante).
- Determinar a viabilidade das culturas probióticas no produto cárneo.
- Verificar o efeito da utilização de culturas probióticas, em substituição total a culturas iniciadoras tradicionais, sobre as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas do produto.
- Analisar o efeito das culturas probióticas na produção de aminas bioativas.
- Selecionar a cepa probiótica mais adequada para a fermentação do produto cárneo.

Segunda Etapa: Estudo *in vitro* utilizando um simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)

O embutido cárneo probiótico que apresentou os melhores resultados na etapa anterior foi submetido a um estudo *in vitro*, objetivando:

- Avaliar a sobrevivência gastrointestinal do microrganismo probiótico.
- Determinar o efeito do produto cárneo probiótico desenvolvido na composição da microbiota intestinal, no teor de amônia e de AGCC.

4. Material e Métodos

4.1 Material

Embutidos cárneos, com teor reduzido de nitrito, nitrato e de gordura, fermentados com culturas iniciadoras tradicionais e probióticas.

4.2 Obtenção do produto cárneo cmbutido fermentado

As diferentes formulações foram processadas com redução de 60% no teor de gordura animal, em três repetições cada, e variaram em relação à cultura iniciadora utilizada e teor de nitrito e nitrato (formulações 2 a 7). Para efeito de comparação, também foi produzido um produto controle (formulação 1). Os processamentos foram na Unidade de Produção e Desenvolvimento de Derivados de Soja - UniverSoja, do Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP.

Formulações:

1 - culturas tradicionais, sem redução de gordura e de sais de cura;

2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%);

3 - culturas tradicionais com redução de gordura e teor reduzido de sais de cura (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%);

4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de sais de cura;

5 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183), com redução de gordura e teor reduzido de sais de cura;

6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e sem redução de sais de cura;

7 – cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e teor reduzido de sais de cura.

Os embutidos cárneos fermentados, com teor reduzido de gordura foram obtidos segundo procedimento para fabricação de salame tipo italiano, proposto por Koutsopoulos; Koutsimanis; Bloukas, 2008; Macedo et al., 2008 e Severini; Pilli; Baiano, 2003, com modificações. Os produtos apresentaram redução de aproximadamente 60% no teor de gordura de porco adicionada nas formulações tradicionais (20g/100g – Terra, 1998). Para preservar as características sensoriais do embutido, óleo de oliva extravirgem, pré-emulsificado com caseinato de sódio (2%), foi utilizado como substituto parcial da gordura de porco. Os embutidos com teores de gordura e de sais de cura reduzidos foram formulados para apresentar concentração de nitrito e de nitrato 50% inferior à observada nas formulações tradicionais (Tabela 1).

Tabela 1. Formulação dos embutidos com substituição da gordura animal por óleo de oliva.

Matérias-primas	Embutidos com teor reduzido de gordura (%)	Embutidos com teores reduzidos de gordura e de sais de cura (%)
Carne suína	61,5	61,5
Carne bovina	28,5	28,5
Gordura suína	8	8
Óleo de oliva	2	2
Ingredientes*		
Cloreto de sódio	2,5	2,5
Ascorbato de sódio	0,5	0,5
Sacarose	0,5	0,5
Lactose	0,7	0,7
Alho em pó	0,05	0,05
Pimenta branca	0,13	0,13
Nitrito	0,015	0,007
Nitrato	0,005	0,003

*% relativa ao conteúdo total de matérias-primas.

KOUTSOPOULOS; KOUTSIMANIS; BLOUKAS, 2008; MACEDO et al., 2008; SEVERINI; PILLI; BAIANO, 2003, com modificações.

A matéria-prima carne foi moída em disco de aço inox de 5 a 8 mm e misturada aos demais ingredientes, em misturador de carnes, por aproximadamente 5 minutos. A gordura de porco congelada foi cortada manualmente e adicionada à mistura. A seguir, as culturas iniciadoras foram incorporadas e a massa carne resultante foi embutida em tripas artificiais de celulose de 50 mm de diâmetro. As peças, de aproximadamente 15 cm de comprimento, foram mantidas em câmara BOD (Biochemical Oxygen Demand) durante 30 dias, utilizando um termohigrômetro para monitorar temperatura e umidade (Marca Equitherm, modelo TH-439) (Figuras 1 e 2, Tabela 2) (KOUTSOPOULOS; KOUTSIMANIS; BLOUKAS, 2008; MACEDO et al., 2008). As culturas iniciadoras probióticas e comerciais foram adicionadas em quantidade suficiente para alcançar número de células viáveis mínimo de 10^8 UFC/g.

Após o período de fermentação e maturação, os embutidos foram embalados a vácuo e armazenados sob refrigeração em refrigerador doméstico (4°C), por um período de 90 dias, totalizando 120 dias de estudo.

Figura1. Fluxograma de processamento dos embutidos cárneos.

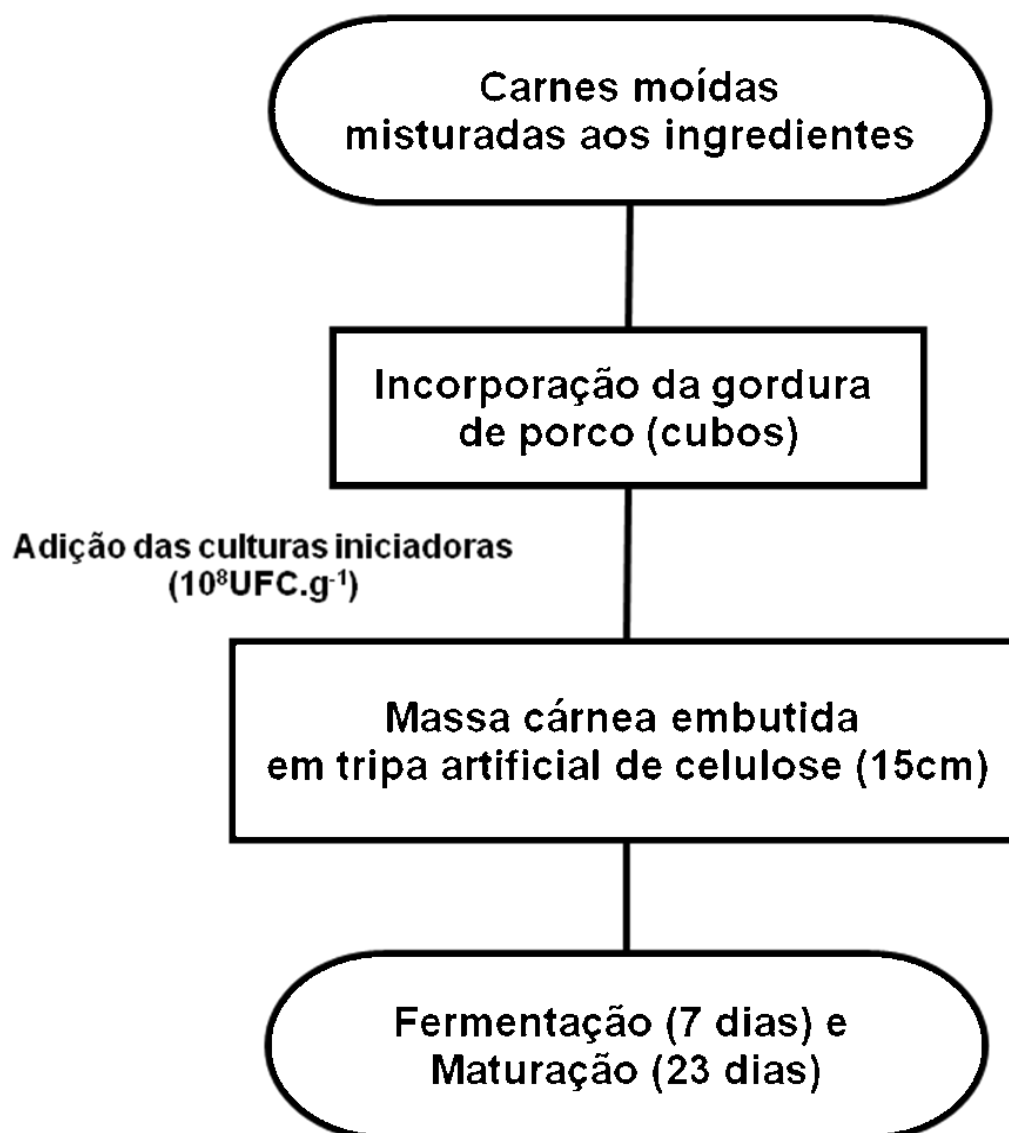


Figura 2. Obtenção dos produtos cárneos fermentados.



Misturador de carne, ensacadeira, câmara BOD.

Tabela 2. Condições operacionais de processamento dos embutidos cárneos.

Tempo (Dias)	Temperatura (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)
<i>Fermentação</i>		
1	25	89
2	24	89
3	23	88
4	22	88
5	21	87
6	20	86
7	18	80
<i>Maturação</i>		
8-30	15	75
<i>Armazenamento</i>		
31-120	4	Não controlada

KOUTSOPOULOS; KOUTSIMANIS; BLOUKAS, 2008; MACEDO et al., 2008.

Preparo dos inóculos

A cultura iniciadora tradicional foi composta de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* (Floracarn SPX – C. Hansen Ind. e Com. Ltda, Valinhos, Brasil). Como culturas probióticas foram utilizadas as cepas de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL1014, procedentes do Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA, San Miguel de Tucumán, Argentina), cujas propriedades hipolipemiantes e cardioprotetoras foram demonstradas em estudos anteriores (CAVALLINI, 2009; CAVALLINI et al 2009; MIGUEL, 2009; ROSSI et al., 1984; ROSSI et al. 2003;). As culturas probióticas foram propagadas em caldo M17 (Himedia, Índia), por 24hs a 37°C (*Enterococcus faecium* CRL183) ou caldo MRS (Man Rogosa Sharpe, Himedia, Índia) por 72hs a 37°C (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014). Após esse período, as células foram precipitadas por centrifugação (1173 x g/ 15 minutos, 4°C) e lavadas com água fosfatada. O número de células viáveis foi determinado para ajustar a quantidade do inóculo.

4.3 Métodos

Primeira etapa: estudo no produto

As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Probióticos da FCFAr – UNESP.

As determinações de pH, acidez titulável, atividade de água e perda de peso foram realizadas nos tempos 1, 3, 5, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias. A composição centesimal foi determinada no início do processamento e no final dos períodos de maturação e estocagem. As demais características físico-químicas e os parâmetros microbiológicos foram avaliados no início do experimento, no final dos períodos de fermentação e maturação e, a cada 30 dias durante a estocagem. Todas as análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas em triplicata.

4.3.1 Sensibilidade das culturas probióticas frente à concentração de cloreto de sódio (NaCl) e nitrito de sódio

As culturas probióticas foram testadas quanto à resistência ao NaCl (1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 3,0% - Synth, Brasil) e ao nitrito de sódio (80, 100, 120, 150 e 200 ppm - Synth, Brasil), adicionados ao meio MRS ágar (*L. acidophilus*) ou M17 ágar (*E. faecium*). Após reativação, 1 mL dos inóculos probióticos (diluição 10^{-7}) foram semeados em profundidade nos meio específicos, adicionados de diferentes concentrações de sais de cura, ou não (controle) e incubados a 37°C/48 horas. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e comparados com o controle (ARIHARA; ITOH, 2000).

4.3.2 Produção de Bacteriocinas

A produção de bacteriocinas pelas cepas probióticas (*E. faecium* CRL 183 e *L. acidophilus* CRL1014) foi estudada pela técnica *spot-on-lawn*, utilizando como indicadores *Listeria monocytogenes* IAL 628, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* IAL 2431 e *Escherichia coli* IAL

339, adquiridas do Instituto Adolf Lutz – São Paulo (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991). A produção de bacteriocinas foi indicada pela presença de halo de inibição ao redor da colônia.

4.3.3 Análises físico-químicas

- **Composição centesimal:** Os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídeos foram determinados segundo a AOAC (Association of official analytical chemists, 2005). A determinação dos teores de carboidratos totais foi realizada por diferença (FUCHS et al., 2005). O teor calórico dos produtos foi calculado com base no conteúdo de proteínas, lipídeos e carboidratos, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{VCT (valor calórico total)} = [\text{proteínas (g)} \times 4] + [\text{carboidratos (g)} \times 4] + [\text{lipídeos (g)} \times 9]$$

- **Atividade de água:** A atividade de água foi determinada em amostras previamente trituradas, utilizando-se medidor de atividade de água (AQUALAB CX-2, EUA).
- **pH e Acidez titulável:** As modificações do pH foram monitoradas em pHmetro (Qualxtron, modelo 8010, Brasil), em amostras preparadas pela mistura de 20g de salame e 80mL de água destilada. A acidez titulável foi determinada por titulação com NaOH (Synth, Brasil) 0,1N e expressa em mL de NaOH/100g (LIAROS; KATSANIDIS; BLOUKAS, 2009).
- **Perda de peso:** Foi determinada pelo método gravimétrico, mediante a pesagem dos embutidos, imediatamente após o embutimento e nos períodos de fermentação, maturação e estocagem, sendo expressa como porcentagem do peso inicial (LIAROS; KATSANIDIS; BLOUKAS, 2009).
- **Cor:** Foi determinada em colorímetro Hunterlab (Color Quest XE, EUA) no Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da FCFAR – UNESP, utilizando iluminante D65 e ângulo visual de 10°. Valores de L*, a* e b* foram determinados como indicadores de luminosidade, índice de cor vermelha e índice de cor amarela, respectivamente (LIAROS; KATSANIDIS; BLOUKAS, 2009).

- **Oxidação lipídica:** A extensão da rancidez oxidativa foi determinada pelo teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) (KOUTSOPOULOS; KOUTSIMANIS; BLOUKAS, 2008). Em um tubo de centrífuga, colocou-se 2 g de amostra, 5 mL de TBA (0,02M) e 10 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. Após centrifugação por 5 minutos a 3500 rpm, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e uma alíquota de 8 mL do filtrado foi transferida para um tubo de ensaio de tampa rosqueável. Colocou-se o tubo em banho-maria por 35 minutos à 100°C, para desenvolvimento da cor relativa à reação, sendo resfriado logo em seguida quando então a absorbância foi medida em espectrofotômetro à 532 nm. Foi realizada uma curva padrão a partir de uma solução estoque ($1 \times 10^{-3}M$) de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano (TEP), utilizando concentrações de 10, 30, 40, 50, 60 e 70µl de TEP (GRAY, 1978).
- **Medida instrumental de textura:** O perfil de textura foi avaliado utilizando um analisador de textura TA-XTplus (Stable micro systems, Reino Unido), através do teste TPA (*Texture profile analysis*) no Laboratório de Farmacotécnica da FCFAR - UNESP (BOURNE, 1978). No modo TPA, a prova analítica (10 mm de diâmetro) desce a uma velocidade constante de 1 mm/s, penetra 10 mm na amostra e volta até a sua superfície numa velocidade de 0,5 mm/s. Após este primeiro ciclo, a prova permanece em repouso por 5 s, quando então inicia a segunda compressão (EXPONENT LITE, 2009). Foram avaliados os seguintes parâmetros: dureza, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade (LIAROS; KATSANIDIS; BLOUKAS, 2009).
- **Determinação de aminas bioativas:** Foi realizada na UNICAM, em Camerino, na Itália. Alíquotas de 2,5 g das amostras foram homogeneizadas durante dois minutos, utilizando um Ultra-Turrax 18N S-G 10 (IKA-Werke GmbH & Co., Staufen, Alemanha) com 25 mL de TCA a 5% para extração das aminas bioativas (putrescina, cadaverina, tiramina, histamina, espermina, espermidina, fenilalanina e triptamina) e centrifugou-se a 5000 rpm durante 10 min. Adicionou-se 5 ml de hexano e agitou-se em vortex durante 5 minutos, centrifugando a 5000 rpm durante

10 min, e em seguida, a fase superior foi descartada e a fase inferior (solução ácida) foi filtrada. O processo de derivação com cloreto de dansil foi baseado no método proposto por Rea, et al (2005). Uma alíquota de 1 mL da solução ácida foi misturada com 200 µL de NaOH 2 M, 300 µL de uma solução saturada de NaHCO₃, e 2 mL de cloreto de dansil (10 mg/mL de acetona). A reação de dansilação foi conduzida no escuro, a 40°C durante 45 min, e sob agitação magnética. Em seguida, o cloreto de dansil residual foi destruído pela adição de 100 µL de 28% de NH₄OH. A mistura foi evaporada de modo a originar 1,6 mL sob fluxo de N₂. O resíduo aquoso foi purificado em cartucho Strata C18-E (6 mL, 500 mg) que foi ativado com 2 x 2 mL de acetonitrila, condicionada com 2 x 2 mL de água. Em seguida o resíduo aquoso passou pelo cartucho a uma velocidade de 0,5 mL/min; o cartucho foi, então, lavado com 2 x 2 mL de água e secou-se completamente, em seguida a eluição foi realizada utilizando 4 mL de acetonitrila. O eluato foi filtrado em filtro de PTFE de 0,45 µm, injetado em Cromatografo Líquido de Alta Eficiência, com detector DAD (diode array) (Hewlett Packard, HP-1090 Series II, EUA) (SAGRATINI et al., 2012 com modificações).

- **Determinação de perfil de ácidos graxos:** Realizada no Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF – USP. A quantificação de ácidos graxos foi precedida pela extração da fração lipídica (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957) e, os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram obtidos segundo método de Hartman e Lago adaptado para microescala (MENEZES et al., 2013). As análises de FAME foram realizadas num cromatógrafo de gás Varian GC (modelo 430 GC, Varian Chromatograph Systems, Walnut Creek, EUA), equipado com um auto injector CP 8412. O software Galaxie foi utilizado para quantificação e identificação dos picos. As injeções foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida de 100nm (ID = 0,25 mm) revestida com 0,2 micrômetros de polietilenoglicol (SP-2560, Supelco, EUA), utilizando Hélio como gás de arraste a uma pressão isobárica de 37 psi, à velocidade linear de 20 cm/s, gás: Hélio a 29 mL/min, com razão de split de 1:50, volume

injetado: 1,0 µL. A temperatura do injetor foi de 250°C e a temperatura do detector foi fixada a 280°C. O forno operou a temperatura inicial de 140°C durante 5 min, programado para aumentar para 240°C a uma velocidade de 4° C/min, e mantido isotermicamente durante 30 min. Composição qualitativa das amostras foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos produzidos após injectar as amostras metiladas com as dos respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi obtida por normalização de área e expressa como percentagem de massa, de acordo com o Método Oficial AOCS Ce 1-62. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores relatados são a média das duas corridas (SILVA et al., 2011).

4.3.4 Análises Microbiológicas

Segurança microbiológica

Amostras de 25 g dos embutidos foram cortadas assepticamente e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada. Diluições seriais foram preparadas e a inoculação foi feita em meios de cultura seletivos para cada gênero/espécie estudado: *Staphylococcus aureus* - ágar Baird Parker, 37°C/48h (Acumedia, EUA) e confirmação pelo teste de coagulase (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001); Coliformes totais e *E.coli* (UFC/g) - método Petrifilm™ *E.coli*/Coliform count plate (3M, Brasil) - 37°C/48h (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001); *Salmonella* spp. (UFC/g) - pré-enriquecimento em água peptonada tamponada; enriquecimento seletivo em caldo Tetrationato (TT - Acumedia, EUA) e caldo Rappaport-Vassiliadis (RV - Acumedia, EUA); multiplicação em ágar Hekton-enteric (HE - Acumedia, EUA) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD - Acumedia, EUA). Colônias características foram submetidas a testes bioquímicos: ágar triplice ferro (TSI - Acumedia, EUA), ágar lisina ferro (LIA- Acumedia, EUA) e ágar uréia (UA - Acumedia, EUA) (DOWNES; ITO, 2002). Análises de *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* foram realizadas no Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) no Instituto de Tecnologia de

Alimentos (ITAL), Campinas - SP. Três triplicatas foram realizadas para cada espécie/grupo de microrganismo.

Viabilidade dos microrganismos probióticos no produto

A determinação da população de microrganismos do gênero *Enterococcus* spp. foi realizada por plaqueamento em meio seletivo KF *Streptococcus* agar (37°C/48h – Accumedia, EUA) e a confirmação do gênero em meio agar bile esculina azida (Accumedia, EUA), para todas as colônias com morfologias distintas. Para o gênero *Lactobacillus* spp. foi utilizado MRS agar (37°C/72h, anaerobiose). As colônias com morfologias diferentes (três de cada formulação) foram congeladas para posterior identificação de espécies, utilizando o sistema API-20 Strep e API 50 CH (Biomérieux, França).

4.3.5 Análise Sensorial

Teste de Aceitação

No teste de aceitação foram avaliados os atributos de aparência, cor, aroma, textura, sabor e impressão global, sendo utilizada uma escala hedônica estruturada mista de nove pontos, com as extremidades 9 (gostei muitíssimo) e 1 (desgostei extremamente) (Anexo 1) (STONE; SIDEL, 1993). As amostras foram apresentadas em blocos completos casualizados, codificadas com algarismos de três dígitos e de forma monádica. A equipe foi composta por 60 consumidores não treinados, habituados ao consumo de salame. Todos os voluntários do estudo concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCF – UNESP Araraquara (nº 0657.4912.2.0000.5426) (Anexo 2). Os testes de aceitação foram realizados no T30, final do período de maturação e cada 30 dias de armazenamento (T60, T90 e T120) no Laboratório de Análise Sensorial da FCFAr – UNESP.

No teste de intenção de compra, utilizou-se uma escala de 5 pontos (1 = certamente não compraria, 2 = provavelmente não compraria, 3 = tenho dúvidas se compraria, 4 = provavelmente compraria, 5 = certamente compraria) (Anexo 3) (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999).

Análise Descritiva Quantitativa

Os candidatos pré-selecionados (30 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Anexo 4), por meio de testes triangulares aplicados à análise sequencial de Wald (AMERINE; PANGBORN; ROESSLER, 1965; MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999), realizaram o levantamento dos termos descritores sensoriais dos embutidos cárneos através do método rede (Repertory Grid Kelly's Method - MOSKOWITZ, 1983). As fichas de avaliação foram montadas com os termos descritores que melhor caracterizaram as amostras, sendo utilizadas escalas não estruturadas de nove centímetros, ancoradas nos pontos extremos pelos termos: “fraco”, “pouco”, “nenhum” ou “forte”, “muito”.

A seguir foi realizada a definição dos termos descritores, a escolha de referências para cada extremo da escala e o treinamento dos julgadores. A seleção da equipe definitiva foi realizada com base no poder de discriminação entre as amostras ($p < 0,30$), repetibilidade ($p > 0,05$) e concordância entre os julgadores (DAMÁSIO; COSTELL, 1991). As amostras foram apresentadas para análise codificadas com algarismos de três dígitos, aleatorizadas, de forma monádica e com quatro repetições, no produto pronto para consumo (T30).

Todas as etapas da AQD foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial da FCFAr – UNESP.

Segunda etapa: Avaliação do embutido probiótico em um sistema de cultura contínuo - Simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)

O simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH), localizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFAr – UNESP, é formado por cinco reatores sucessivos e conectados, que representam os diferentes segmentos do trato gastrointestinal humano, com seus respectivos valores de pH, tempo de residência e capacidade volumétrica (Figura 1). Os cinco reatores foram continuamente agitados por um agitador magnético e mantidos a temperatura de 37°C por meio de um termostato. O meio foi mantido em anaerobiose, através da injeção diária de N₂ durante 30 minutos e o pH adequado de cada porção do trato foi controlado automaticamente pela adição de NaOH 1M ou HCL 1M (POSSEMIERS et al., 2004; MOLLY et al., 1994).

Cada reator possui oito portas: entrada e saída do meio, amostragem da fase líquida e do espaço ocupado pelos gases, pH-eletrodo, pH-controle (ácido e base) e injeção de gases. Para a transferência sucessiva das amostras entre os reatores foram utilizadas bombas peristálticas. As bombas nomeadas de a-d trabalharam de forma semi-contínua e o restante (e-g) (Figura 3), de forma contínua (MOLLY et al., 1994), simulando o trato gastrointestinal.

A passagem do alimento pelo intestino delgado foi simulada pelo Reator 2 através da adição de 60 ml de suco pancreático e biliar artificiais, a uma taxa de 4mL/min, por 15min, duas horas após a adição do embutido cárneo probiótico (MOLLY; WOESTYNE; VERSTRAETE, 1993; POSSEMIERS et al., 2004).

No início do experimento, os últimos três reatores foram inoculados com amostra de fezes de um doador adulto voluntário - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Anexo 5), que não havia utilizado antibiótico por um período de dois anos antes do início do experimento. A amostra de fezes (60g) foi diluída dez vezes com tampão fosfato (0,05 mol/L de Na₂HPO₄, 0,05 mol/L de NaH₂PO₄ e 0,1% de Na-thioglicolato; pH=6,5), agitada em stomacher (10 minutos) e centrifugada (5

minutos a 3000 rpm). Um volume de 40 mL do sobrenadante obtido foi adicionado aos reatores 3, 4 e 5.

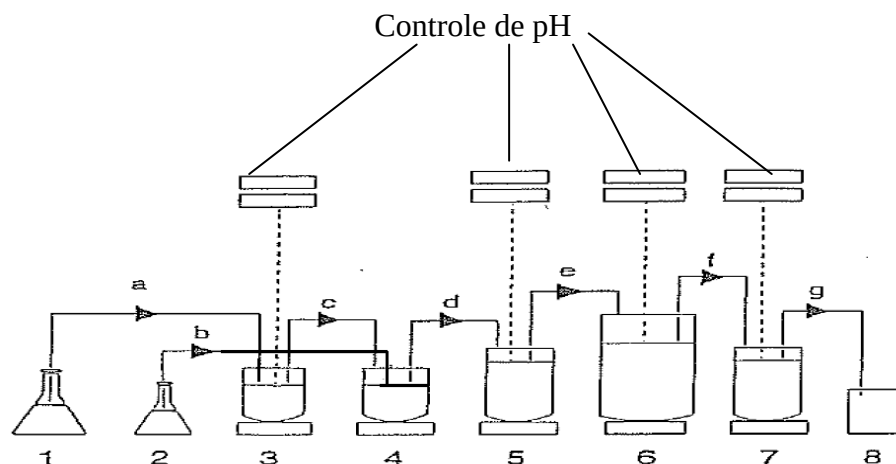
Tabela 3. Valores de volume, tempo de residência e pH estabelecidos em cada um dos reatores do simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)

Reator	Volume (ml)	Tempo de residência (h)	pH
R1: Estômago	200	2,5	2,0
R2: Intestino delgado	200	4	-
R3: Cólon ascendente	500	20	5,6-5,9
R4: Cólon transversal	800	32	6,1-6,9
R5: Cólon descendente	600	24	6,6-6,9

Fonte: POSSEMIERS et al. (2004)

O protocolo experimental utilizando este tipo de reator foi previamente descrito por Van de Wiele et al., (2007) e inclui três períodos: período controle; período de tratamento e período pós-tratamento. O período controle de duas semanas (após a inoculação da amostra de fezes) permitiu a adaptação das bactérias intestinais às condições ambientais presentes nos diferentes compartimentos do cólon e a formação de uma comunidade microbiana estável. Durante este período, o meio alimentar basal (Tabela 4) passou pelo sistema três vezes ao dia, possibilitando a adaptação da comunidade microbiana às condições físico-químicas e nutricionais que predominam nas diferentes partes do cólon (MOLLY; WOESTYNE; VERSTRAETE, 1993). Após as duas semanas de adaptação foi iniciado o Período de Tratamento, onde o embutido cárneo probiótico, selecionado na etapa anterior, passou pelo sistema duas vezes ao dia, juntamente com o alimento basal, durante quatro semanas. O Período de Tratamento foi sucedido pelo Período de Pós-tratamento, com duração de duas semanas, em que somente o meio basal entrou no sistema.

Figura 3. Representação dos reatores do simulador do ecossistema microbiano humano.



1, alimento basal; 2, suco pancreático; 3, Reator 1 (estômago); 4, Reator 2 (duodeno); 5, Reator 3 (Cólon ascendente); 6, Reator 4 (Cólon transverso); 7, Reator 5 (Cólon descendente). As letras de a-g representam as bombas de transferência dos produtos entre os reatores. Controladores de pH nos reatores 3, 5, 6 e 7.

Tabela 4. Composição do meio alimentar basal dissolvido em água destilada.

Constituintes	Quantidades (g/L)
Amido	3,0
Pectina	2,0
Mucina (Suíno gástrica tipo III)	4,0
Xilana	1,0
Peptona	1,0
Triptona	1,0
Glicose	0,4
Extrato de levedura	3,0
L-cisteína	0,5

Fonte: PAYNE et al.(2003)

4.3.6 Análise de ácidos graxos de cadeia curta e amônia

Durante todo o período experimental (Controle, Tratamento e Pós-tratamento) foram coletadas, semanalmente, amostras dos reatores 3, 4 e 5 para análise de AGCC e amônia. A produção dos ácidos láctico, butírico, propiônico e acético foi monitorada por cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama e injetor capilar split/splitless (Shimadzu GC 2010, Japão) e coluna HP-INNOWAX (Agilent Technologies, EUA), de 30m x 0,25mm x 0,25µm, usando hidrogênio como gás de arraste com um fluxo de 1,56 mL/min. As temperaturas da coluna, do injetor e do

detector foram 170, 250 e 280°C, respectivamente (VAN DE WIELE et al., 2004; VAN DE WIELE, et al., 2007). O teor de amônia foi determinado utilizando-se um medidor de íon seletivo, acoplado a um eletrodo de íon seletivo para amônia (modelo 95-12, Orion, Thermo Scientific, EUA) (BEDANI, 2008). As análises de AGCC foram realizadas na Escola de Engenharia de São Carlos – USP e as de amônia no Laboratório de Pesquisa em Probióticos da FCFAr – UNESP.

4.3.7 Análises microbiológicas

Semanalmente, durante todo o período experimental (controle, tratamento e pós-tratamento), foram coletadas amostras (5mL) dos reatores 3, 4 e 5 para as análises microbiológicas, realizadas no Laboratório de Pesquisa em Probióticos da FCFAr – UNESP.

A análise da composição da microbiota fecal foi baseada na enumeração de bactérias aeróbias e anaeróbias totais, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., Enterobactérias, *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. e *Enterococcus* spp. As amostras coletadas foram diluídas e inoculadas em meios de cultura seletivos: aeróbios e anaeróbios totais (ágar Standard Methods – Accumedia, EUA - 37°C/48h, aerobiose e anaerobiose, respectivamente); *Lactobacillus* spp. (ágar Man Rogosa Sharp - Himedia, Índia - 37°C/48h, anaerobiose) (YOSHIOKA; ISEKI; FUJITA, 1983); *Bifidobacterium* spp. (BIM-25 - Difco, França - 37°C/72h, anaerobiose) (MUNOA; PARES, 1988); Enterobactérias (ágar MacConkey - Accumedia, EUA - 37°C/48h) (BRIGIDI *et al.*, 2001); *Bacteroides* spp. (ágar Bacteróides Bile Esculina - Accumedia, EUA - 37°C/72h, anaerobiose) (LIVINGSTON; KOMINOS; YEE, 1978); *Clostridium* spp. (RCA - Difco, França - 37°C/48h, anaerobiose) (MARZOTTO *et al.*, 2006); *Enterococcus* spp. (ágar KF *Streptococcus* - Accumedia, EUA - 37°C/48h) (EDLUND *et al.*, 2000).

4.3.7.1 Determinação da sobrevivência gastrintestinal de *Enterococcus faecium*

As colônias com morfologias distintas do *Enterococcus faecium*, que crescerem no ágar KF *Streptococcus*, foram transferidas para o meio agar bile esculina azida e posteriormente foram

submetidas à testes bioquímicos (kit API-20 Strep - Biomérieux, França). Depois foi realizado teste molecular – *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para confirmação de espécie. Esse teste foi importante para garantir que o microrganismo probiótico utilizado na elaboração do embutido se manteve viável durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Determinações realizadas no Laboratório de Pesquisa em Probióticos da FCFAr – UNESP.

4.3.8 PCR *Enterococcus faecium*

A extração do DNA genômico das colônias que crescerem no meio ágar bile esculina azida - isoladas semanalmente dos reatores 3, 4 e 5, durante todo o período experimental (controle, tratamento e pós tratamento) - foi realizada utilizando o Stool Kit (Qiagen, EUA). ***Enterococcus faecium*** - **Primers:** Enf 1 (5'-ATTACGGAGACTACACACTTTG-3') e Ent 2 (5'-TAGCCATAGAAGTTACATCAAG-3'), referentes à região 16S-23S rRNA. **Condições de reação:** 1,5 mmol.L⁻¹ de MgCL₂, 100 µmol de desoxiribonucleotídeos, 1 µmol de cada primer, 2 ng de DNA genômico e 2U de enzima Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 µL. **Parâmetros para a amplificação:** 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 53°C e 1 minuto a 72°C. O programa também incluiu a pré-incubação a 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 72°C e extensão final a 72°C por 5 minutos (LANGA et al., 2003; CANO et al., 2007).

4.3.9 DGGE (Eletroforese em gel com gradiente desnaturante) e análise de agrupamentos (Dendogramas)

Os “primers” de oligonucleótidos, utilizados como ponto de partida para a replicação do DNA, foram 968FGC – 1401R (NUBEL et al. 1996). A reação da polimerização em cadeia (PCR) do DNA foi realizada utilizando-se o Go Taq Green Master Mix (PROMEGA, Brasil). As amostras foram amplificadas em termociclador (System 2400 thermocycler - Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.) utilizando-se o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min.; 35

ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 s, anelamento a 55°C por 45 s, extensão a 72° C por 45 s, extensão final a 72°C durante 7 min, seguido de um resfriamento a 4°C. A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) previamente descrita por Heilig et al. (2002), foi realizada utilizando um gel de poliacrilamida a 8%, com um gradiente desnaturante de 45-65%, durante 16 h, a 75 V em tampão TAE x 1 à temperatura constante de 60°C. Os géis foram corados com brometo de etídio e a imagem foi capturada pelo sistema de Fotodocumentação L.Pix Touch (Loccus Biotecnologia) e analisadas pelo Software BioNumerics versão 3.5 (Applied Maths, Bélgica).

O dendograma é um gráfico gerado por uma técnica que separa as amostras em grupos que compartilham características semelhantes (perfis de conjuntos de bandas), a partir de uma matriz de similaridade gerada pela presença, ausência e intensidade das bandas do DGGE. Neste gráfico estão dispostas linhas ligadas segundo os níveis de similaridade que agruparam pares de espécies ou de variáveis (ALVES; BELDERRAIN; SCARPEL, 2007). A similaridade do padrão de bandas intra-gel foi verificada utilizando-se o coeficiente de similaridade e correlação de Pearson e agrupados por UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic). O índice de diversidade de Shannon e a dominância foram calculados usando o Software PAST.

As análises de composição da microbiota por DGGE foram realizadas na Escola de Engenharia de São Carlos – USP.

4.4 Análise estatística dos resultados

Os valores obtidos para todos os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey (programa BioEstat 5.0). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Os resultados dos testes de aceitação foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de médias de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados da ADQ foram analisados por ANOVA com dois fatores (assessores e amostras) e sua interação, seguido pelo teste de médias de Tukey ($p < 0,05$) e

Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando o Statistical Analysis System 9.1.2 SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, 2008).

5. Resultados e Discussão

Primeira Etapa: Estudo das culturas probióticas no produto

5.1 Sensibilidade das culturas probióticas frente ao cloreto de sódio (NaCl) e ao nitrito de sódio

A utilização de cepas resistentes aos sais de cura (cloreto de sódio e nitrito de sódio) é fundamental para a obtenção de embutidos probióticos, uma vez que, NaCl e nitrito são aditivos indispensáveis para garantir a segurança microbiológica desses produtos (PAPAMANOLI et al., 2003).

Nas análises de sensibilidade aos sais de cura, a cepa *Enterococcus faecium* CRL183 manteve população de células viáveis na ordem de 9 log UFC/mL para todas as concentrações de sais de cura avaliadas, sem diferir do controle em termos absolutos. Por outro lado, a cepa *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 apresentou redução na população de células viáveis na presença de diferentes concentração de cloreto de sódio e nitrito de sódio, diferindo significativamente do controle ($p < 0,05$). A redução na população de *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 foi semelhante para todas as concentrações de NaCl avaliadas (- 1,3 log UFC/g). Por outro lado, para o nitrito de sódio a maior redução foi verificada com a adição de 200 ppm (- 0,5 log UFC/g) (Tabela 5).

A capacidade de resistir aos sais de cura é um efeito cepa-específico. Trabalho conduzido por Sameshima et al. (1998) concluiu que das 202 espécies de *Lactobacillus* spp. avaliadas, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* mostraram-se resistentes à presença de sais de cura. Macedo (2005) avaliou as cepas *Lactobacillus casei* (LC 01), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (ATCC 10746/ CCT 0566) e *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (ATCC 7469/ CCT 6645) quanto a resistência aos sais de cura. Os resultados evidenciaram que todas as cepas resistiram às concentrações de NaCl (1% a 3%) e nitrito (80 ppm a 200 ppm) testadas, sem redução na população de microrganismos em comparação com o controle.

Apesar da redução na viabilidade observada, as duas cepas avaliadas no presente estudo poderiam ser utilizadas como culturas iniciadoras em produtos cárneos fermentados, pois, apresentaram população de células viáveis final superior a recomendada para que os efeitos benéficos atribuídos aos probióticos sejam observados (6 log UFC/g) (LÜCKE, 2000; FERREIRA, 2003; THARMARAJ; SHAH, 2003).

Tabela 5. População de células viáveis de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 (log UFC/mL), frente às diferentes concentrações de NaCl e NaNO₂.

Concentração de sal de cura		Células viáveis (log UFC/mL)	
		<i>Enterococcus faecium</i> CRL 183	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1014
NaCl (%)	0	9,44 ^b ±0,08	9,41 ^a ±0,07
	1	9,77 ^a ±0,02	8,11 ^b ±0,01
	1,5	9,73 ^a ±0,02	8,11 ^b ±0,04
	2	9,66 ^a ±0,03	8,15 ^b ±0,03
	2,5	9,52 ^b ±0,05	8,10 ^b ±0,09
	3	9,39 ^b ±0,07	8,14 ^b ±0,06
NaNO ₂ (ppm)	0	9,41 ^{b,c} ±0,05	9,43 ^a ±0,03
	80	9,61 ^a ±0,07	8,92 ^{b,c} ±0,01
	100	9,53 ^{a,b} ±0,03	8,93 ^b ±0,02
	120	9,43 ^{b,c} ±0,03	8,89 ^{b,c,d} ±0,01
	150	9,41 ^{b,c} ±0,10	8,96 ^b ±0,01
	200	9,34 ^c ±0,06	8,85 ^d ±0,01

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

5.2 Produção de substâncias antimicrobianas/bacteriocinas

Os resultados demonstraram que as cepas probióticas avaliadas (*Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL1014) não são produtoras de substâncias antimicrobianas, especificamente contras os microrganismos utilizados como indicadores (*Listeria monocytogenes* IAL 628, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar *typhimurium* IAL 2431, e *Escherichia coli* IAL 339), pois não verificou-se a formação de halo de inibição no teste *spot-on-lawn* (Figura 4). Como o

teste inicial foi negativo para produção de substâncias antimicrobianas não foi necessária a continuação das análises para confirmação de produção de bacteriocinas (sensibilidade à protease e ação de bacteriófagos líticos).

As condições utilizadas nesse teste (meio de cultura isento de sacarose ou outro açúcar fermentável – TSAYE - e incubação em anaerobiose) são capazes de excluir a inibição de patógenos em função da presença de ácidos orgânicos e de peróxido de hidrogênio (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991). Dessa forma, mesmo não se constatando a produção de bacteriocinas contra os microrganismos indicadores utilizados, as cepas probióticas poderiam exercer o efeito protetor desejado em função da produção de ácidos orgânicos e/ ou peróxido de hidrogênio, ou mesmo através da produção de bacteriocinas contra outros gêneros/espécies de microrganismos não avaliados no presente estudo.

Figura 4. Teste *spot-on-lawn* para verificação de produção de substâncias antimicrobianas. Placa com ausência de halo de inibição.

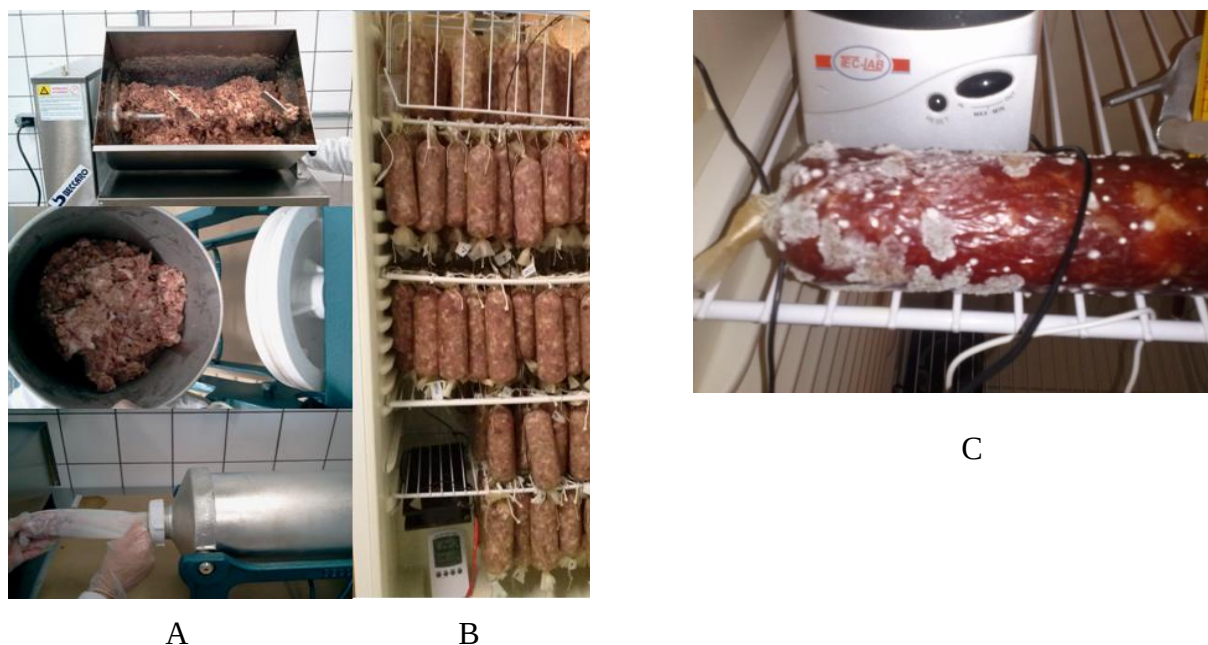


5.3 Elaboração dos embutidos cárneos fermentados com teor reduzido de nitrito, nitrato e gordura, fermentado com culturas iniciadoras probióticas

Para o ajuste das condições ideais de processamento dos embutidos cárneos foram realizados alguns estudos preliminares. Tais estudos foram de extrema importância para a determinação da

capacidade máxima da câmara BOD, utilizada nas etapas de fermentação e maturação dos embutidos e para adequação das formulações (Figura 5).

Figura 5. Determinação das condições ideais de processamento dos embutidos.



A) matérias-primas e ingredientes no misturador e na ensacadeira. B) Câmara BOD. C) Embutido com bolores na superfície.

Considerando a quantidade de embutidos necessária para a caracterização do produto, concluiu-se que seria possível o processamento de apenas três formulações por vez, para que a temperatura e a umidade no interior da câmara permanecessem constantes durante as diferentes etapas do processo. Nos testes iniciais verificou-se, também, o aparecimento de bolores na superfície dos embutidos. Para sanar esse problema, antes do envase, a tripa artificial foi imersa em solução de sorbato de potássio (conservador) a 10%.

5.4 Caracterização dos produtos

Determinação de perda de peso, acidez titulável, atividade de água e pH.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados de perda de peso, acidez titulável, atividade de água e pH, durante as diferentes etapas do estudo.

No final do período de maturação (T30), a redução de peso (%) dos embutidos, em relação ao tempo inicial (T0), foi de 38,82%, 40,51%, 48,57%, 46,64%, 46,09%, 47,70% e 46,72% para as formulações F1, F2, F3, F4, F5, F6 e F7, respectivamente. No T30, as formulações passaram a apresentar diferença estatística entre si, mantendo-se assim até o penúltimo tempo de análise (T105), com a formulação 1 (controle) exibindo a menor redução de peso, em termos absolutos. No final do período de armazenamento (T120), as formulações apresentaram redução mínima de 50% do peso, sem diferirem significativamente entre si. A redução de peso reflete a quantidade de água perdida pelo embutido durante a secagem, sendo dependente da temperatura e umidade relativa no interior da BOD, do tempo de processamento, do material do invólucro utilizado no embutimento e da composição do produto (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000). De acordo com Muguerza et al. (2001), a redução no nível de gordura em salames ocasiona uma maior perda de peso, característica observada em todas as formulações onde a gordura animal foi substituída por óleo de oliva. A perda de peso das diferentes formulações foi inferior à encontrada por Campagnol; Fries; Terra (2007), que ficou em torno de 60%. A faixa ideal de perda de peso situa-se entre 30% e 40% para produtos secos (RUST, 1994).

A rápida produção de ácidos orgânicos pelas culturas iniciadoras é importante para garantir a segurança, além de influenciar as características de textura, sabor e cor do produto (AMMOR; MAYO, 2007). A acidez titulável não exibiu diferença estatística entre as formulações apenas nos tempos 0, 75 e 120, sendo que a partir do final do período de maturação (T30) observou-se uma tendência de redução nesse parâmetro para a maioria das formulações.

O pH final dos embutidos pode variar de 4,6 a 5,5, sendo dependente da velocidade de acidificação das culturas iniciadoras e da presença de leveduras, como *Derbaryomyces hansenii*, capazes de elevar o pH do produto (AMMOR; MAYO, 2007).

No presente estudo, o pH dos embutidos prontos para o consumo (T30) variou de 4,98 a 5,26, entretanto, não houve diferença estatística entre as formulações no final dos períodos de fermentação (T7) e maturação (T30), indicando que a utilização das cepas probióticas não alterou o processo fermentativo. Quando comparamos os valores de pH no final do tempo de armazenamento (T120), com o final do período de fermentação (T30), as formulações F2 e F7 apresentaram as menores e maiores médias em termos absolutos, respectivamente. O eventual aumento do pH pode ser atribuído ao aparecimento de compostos básicos oriundos da degradação de proteínas e da diminuição de eletrólitos (FERNANDEZ et al., 1997; FONSECA, 1999).

A atividade de água indica a quantidade de água disponível para as reações necessárias para o desenvolvimento dos microrganismos, assim como para a produção de toxinas (JAY, 1994). Dessa forma, a redução na atividade de água inibe a multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos (SIQUEIRA, 1995). De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2000), o salame pronto para o consumo, deve apresentar uma atividade de água máxima de 0,92. No T30, todas as formulações, exceto F2 e F7, exibiram valores de atividade de água inferiores a 0,92, estando, portanto, em acordo com a legislação vigente. A redução nesse parâmetro permaneceu durante o período de armazenamento, sendo que após 15 dias de estocagem à temperatura de refrigeração (T45), todas as formulações atendiam as recomendações da legislação. No final do período de armazenamento (T120), não se observou diferença estatística para este parâmetro, assim como nos tempos 0,7, 30, 45, 60 e 90.

Tabela 6. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) para perda de peso (%), acidez titulável (mL de NaOH/100g), atividade de água e pH ao longo do período de estudo.

Tempo	Formulação	Perda de peso	Acidez titulável	Atividade de água	pH
T0	F1	-	1,72 ^{aC} $\pm$ 0,15	0,984 ^{aA} $\pm$ 0,010	5,96 ^{aA} $\pm$ 0,36
	F2	-	1,55 ^{aC} $\pm$ 0,21	1,000 ^{aA} $\pm$ 0,015	5,99 ^{aA} $\pm$ 0,05
	F3	-	1,49 ^{aF} $\pm$ 0,33	1,000 ^{aA} $\pm$ 0,013	6,11 ^{aA} $\pm$ 0,07
	F4	-	1,73 ^{aC} $\pm$ 0,43	1,017 ^{aA} $\pm$ 0,018	6,02 ^{aA} $\pm$ 0,19
	F5	-	1,74 ^{aF} $\pm$ 0,04	0,981 ^{aA} $\pm$ 0,022	6,10 ^{aA} $\pm$ 0,13
	F6	-	1,87 ^{aE} $\pm$ 0,16	1,009 ^{aA} $\pm$ 0,013	5,59 ^{aA} $\pm$ 0,20
	F7	-	1,81 ^{aD} $\pm$ 0,22	1,015 ^{aA} $\pm$ 0,017	5,87 ^{aA} $\pm$ 0,08
T3	F1	7,57 ^{aH} $\pm$ 1,66	2,23 ^{cBC} $\pm$ 0,18	0,966 ^{bA} $\pm$ 0,019	5,17 ^{abB} $\pm$ 0,16
	F2	9,12 ^{aD} $\pm$ 6,46	2,59 ^{abB} $\pm$ 0,07	1,000 ^{aA} $\pm$ 0,013	4,94 ^{bBC} $\pm$ 0,06
	F3	6,26 ^{aE} $\pm$ 2,67	2,48 ^{bcDE} $\pm$ 0,18	0,999 ^{aA} $\pm$ 0,012	5,13 ^{abB} $\pm$ 0,17
	F4	8,84 ^{aF} $\pm$ 0,88	2,61 ^{abBC} $\pm$ 0,20	1,002 ^{aAB} $\pm$ 0,017	4,92 ^{bC} $\pm$ 0,10
	F5	4,13 ^{aF} $\pm$ 0,85	2,56 ^{abcD} $\pm$ 0,33	0,963 ^{bA} $\pm$ 0,036	5,28 ^{abCD} $\pm$ 0,26
	F6	9,10 ^{aD} $\pm$ 5,53	2,55 ^{abcD} $\pm$ 0,12	1,005 ^{aA} $\pm$ 0,013	5,01 ^{abB} $\pm$ 0,22
	F7	6,41 ^{aF} $\pm$ 1,41	2,91 ^{aBCD} $\pm$ 0,33	1,006 ^{aA} $\pm$ 0,012	5,04 ^{abC} $\pm$ 0,05
T5	F1	17,88 ^{aG} $\pm$ 1,15	3,35 ^{aABC} $\pm$ 0,11	0,953 ^{bAB} $\pm$ 0,028	5,19 ^{aB} $\pm$ 0,22
	F2	15,39 ^{aD} $\pm$ 9,89	2,83 ^{bB} $\pm$ 0,29	0,990 ^{abAB} $\pm$ 0,012	4,96 ^{bBC} $\pm$ 0,10
	F3	17,29 ^{aD} $\pm$ 5,60	3,08 ^{abCD} $\pm$ 0,25	0,996 ^{aA} $\pm$ 0,012	5,14 ^{abB} $\pm$ 0,09
	F4	18,76 ^{aE} $\pm$ 1,72	3,17 ^{abAB} $\pm$ 0,38	0,995 ^{aAB} $\pm$ 0,012	4,95 ^{bC} $\pm$ 0,09
	F5	13,87 ^{aE} $\pm$ 6,49	3,49 ^{aBC} $\pm$ 0,22	0,952 ^{bA} $\pm$ 0,043	5,17 ^{abBCD} $\pm$ 0,14
	F6	17,06 ^{aD} $\pm$ 6,28	3,14 ^{abBCD} $\pm$ 0,22	0,984 ^{abA} $\pm$ 0,027	5,04 ^{abB} $\pm$ 0,13
	F7	17,13 ^{aE} $\pm$ 2,99	3,35 ^{aABC} $\pm$ 0,22	0,99 ^{6aA} $\pm$ 0,013	5,02 ^{abC} $\pm$ 0,11
T7	F1	20,25 ^{aG} $\pm$ 1,21	3,41 ^{abABC} $\pm$ 0,16	0,978 ^{aA} $\pm$ 0,012	5,11 ^{aB} $\pm$ 0,20
	F2	17,03 ^{aD} $\pm$ 10,34	2,82 ^{dB} $\pm$ 0,40	0,996 ^{aA} $\pm$ 0,007	4,97 ^{aBC} $\pm$ 0,08
	F3	20,88 ^{aD} $\pm$ 7,31	3,54 ^{aABC} $\pm$ 0,06	0,998 ^{aA} $\pm$ 0,014	5,12 ^{aB} $\pm$ 0,10
	F4	22,92 ^{aE} $\pm$ 1,83	3,28 ^{abcAB} $\pm$ 0,11	0,992 ^{aAB} $\pm$ 0,023	5,03 ^{aC} $\pm$ 0,09
	F5	16,05 ^{aE} $\pm$ 6,59	3,58 ^{aABC} $\pm$ 0,30	0,993 ^{aA} $\pm$ 0,006	5,15 ^{abCD} $\pm$ 0,12
	F6	18,85 ^{aD} $\pm$ 6,48	3,00 ^{bcdCD} $\pm$ 0,29	0,998 ^{aA} $\pm$ 0,007	4,99 ^{aB} $\pm$ 0,18
	F7	21,18 ^{aE} $\pm$ 4,54	2,92 ^{cdBCD} $\pm$ 0,18	0,999 ^{aA} $\pm$ 0,018	5,14 ^{aBC} $\pm$ 0,05
T15	F1	32,27 ^{aF} $\pm$ 2,25	3,67 ^{abAB} $\pm$ 0,06	0,929 ^{dABC} $\pm$ 0,025	5,00 ^{aB} $\pm$ 0,36
	F2	33,39 ^{aC} $\pm$ 4,27	3,70 ^{abA} $\pm$ 0,14	0,980 ^{aAB} $\pm$ 0,002	4,92 ^{aBC} $\pm$ 0,22
	F3	37,80 ^{aD} $\pm$ 4,69	3,53 ^{bBC} $\pm$ 0,18	0,968 ^{abcA} $\pm$ 0,006	5,11 ^{aB} $\pm$ 0,23
	F4	35,67 ^{aD} $\pm$ 4,73	3,66 ^{bAB} $\pm$ 0,15	0,952 ^{cdBC} $\pm$ 0,019	5,08 ^{aC} $\pm$ 0,19
	F5	36,12 ^{aD} $\pm$ 3,78	3,47 ^{abBC} $\pm$ 0,33	0,955 ^{bcdA} $\pm$ 0,005	5,09 ^{aCD} $\pm$ 0,12
	F6	35,60 ^{aC} $\pm$ 2,56	4,12 ^{aA} $\pm$ 0,72	0,977 ^{abA} $\pm$ 0,005	4,91 ^{aB} $\pm$ 0,10
	F7	36,67 ^{aD} $\pm$ 5,04	3,87 ^{abAB} $\pm$ 0,13	0,950 ^{cdA} $\pm$ 0,010	5,19 ^{aBC} $\pm$ 0,25
T30	F1	38,82 ^{cE} $\pm$ 1,18	3,58 ^{bAB} $\pm$ 0,10	0,916 ^{aABC} $\pm$ 0,026	5,21 ^{aB} $\pm$ 0,28
	F2	40,51 ^{bcBC} $\pm$ 6,51	3,83 ^{abA} $\pm$ 0,39	0,921 ^{aBC} $\pm$ 0,008	5,19 ^{aB} $\pm$ 0,22
	F3	48,57 ^{aB} $\pm$ 3,16	4,18 ^{aA} $\pm$ 0,37	0,915 ^{aB} $\pm$ 0,017	5,26 ^{aB} $\pm$ 0,14
	F4	46,64 ^{abcBC} $\pm$ 1,67	3,93 ^{abA} $\pm$ 0,08	0,912 ^{aCD} $\pm$ 0,027	4,98 ^{aC} $\pm$ 0,16
	F5	46,09 ^{abcC} $\pm$ 4,43	3,64 ^{bABC} $\pm$ 0,26	0,910 ^{aA} $\pm$ 0,023	5,25 ^{abCD} $\pm$ 0,07
	F6	47,40 ^{abB} $\pm$ 5,03	4,13 ^{aA} $\pm$ 0,23	0,893 ^{aB} $\pm$ 0,038	5,11 ^{aB} $\pm$ 0,03
	F7	46,72 ^{abcC} $\pm$ 5,12	3,83 ^{abAB} $\pm$ 0,15	0,945 ^{aA} $\pm$ 0,061	5,04 ^{aC} $\pm$ 0,20
T45	F1	41,69 ^{bDE} $\pm$ 2,45	4,08 ^{aA} $\pm$ 0,23	0,872 ^{aBCD} $\pm$ 0,036	5,04 ^{aB} $\pm$ 0,23
	F2	47,70 ^{abAB} $\pm$ 4,02	3,81 ^{abA} $\pm$ 0,10	0,855 ^{aCD} $\pm$ 0,026	5,15 ^{aB} $\pm$ 0,05
	F3	52,49 ^{aAB} $\pm$ 1,20	3,81 ^{abAB} $\pm$ 0,07	0,877 ^{aBC} $\pm$ 0,040	5,08 ^{aB} $\pm$ 0,29

Continuação Tabela 6

	F4	45,10 ^{bc} ±4,22	3,60 ^{abAB} ±0,23	0,880 ^{aD} ±0,050	5,07 ^{aC} ±0,25
	F5	47,86 ^{abBC} ±4,01	3,27 ^{bc} ±0,13	0,821 ^{aA} ±0,089	5,38 ^{aBC} ±0,20
	F6	51,74 ^{aAB} ±2,67	3,77 ^{abAB} ±0,37	0,832 ^{aC} ±0,019	5,15 ^{aB} ±0,07
	F7	47,31 ^{abBC} ±3,99	3,13 ^{bABC} ±0,86	0,862 ^{aA} ±0,039	5,31 ^{aBC} ±0,11
T60	F1	43,11 ^{cCDE} ±3,67	4,01 ^{abA} ±0,34	0,852 ^{aCD} ±0,042	5,14 ^{bB} ±0,23
	F2	50,73 ^{abAB} ±2,20	3,70 ^{abcA} ±0,15	0,863 ^{aCD} ±0,012	5,03 ^{bB} ±0,11
	F3	54,99 ^{aAB} ±1,70	3,46 ^{cBC} ±0,25	0,870 ^{aBC} ±0,050	5,05 ^{bB} ±0,15
	F4	47,93 ^{bcABC} ±4,56	3,70 ^{abcAB} ±0,21	0,908 ^{aCD} ±0,009	4,88 ^{bc} ±0,16
	F5	52,46 ^{abABC} ±2,72	4,02 ^{abA} ±0,17	0,84 ^{4aA} ±0,032	5,53 ^{aB} ±0,33
	F6	53,16 ^{abAB} ±3,67	3,61 ^{bcABC} ±0,11	0,843 ^{aBC} ±0,028	5,12 ^{bB} ±0,01
	F7	51,56 ^{abABC} ±3,81	4,15 ^{aA} ±0,43	0,851 ^{aA} ±0,062	5,02 ^{bc} ±0,14
T75	F1	44,52 ^{bBCD} ±4,04	3,92 ^{aA} ±0,97	0,871 ^{abBCD} ±0,008	5,14 ^{aB} ±0,46
	F2	53,05 ^{aA} ±1,49	3,29 ^{aAB} ±0,17	0,856 ^{abcCD} ±0,035	5,05 ^{aB} ±0,06
	F3	55,98 ^{aA} ±1,70	3,77 ^{aAB} ±0,05	0,826 ^{bcCD} ±0,015	5,23 ^{aB} ±0,20
	F4	51,47 ^{abABC} ±6,86	3,07 ^{aAB} ±0,13	0,878 ^{aDE} ±0,028	5,34 ^{aBC} ±0,33
	F5	54,68 ^{aAB} ±2,00	3,80 ^{aABC} ±0,06	0,849 ^{abcA} ±0,038	5,01 ^{aCD} ±0,22
	F6	54,84 ^{aAB} ±3,18	3,48 ^{aABC} ±0,37	0,815 ^{cC} ±0,007	5,11 ^{aB} ±0,09
	F7	53,99 ^{aABC} ±3,51	3,58 ^{aABC} ±1,25	0,814 ^{cA} ±0,014	5,28 ^{aBC} ±0,15
T90	F1	48,37 ^{cABC} ±1,10	2,96 ^{bABC} ±0,89	0,820 ^{aD} ±0,054	5,13 ^{aB} ±0,30
	F2	53,77 ^{abA} ±1,73	2,85 ^{bB} ±0,32	0,832 ^{aD} ±0,046	5,09 ^{aB} ±0,05
	F3	56,85 ^{aA} ±1,19	3,38 ^{bBC} ±0,17	0,835 ^{aCD} ±0,001	5,18 ^{aB} ±0,04
	F4	51,19 ^{abcABC} ±4,97	4,35 ^{aA} ±0,13	0,869 ^{aDE} ±0,005	4,98 ^{aC} ±0,01
	F5	55,19 ^{abAB} ±2,14	3,35 ^{bBC} ±0,29	0,851 ^{aA} ±0,016	4,98 ^{aD} ±0,14
	F6	55,60 ^{abAB} ±2,65	2,69 ^{bD} ±0,38	0,810 ^{aC} ±0,011	5,02 ^{aB} ±0,10
	F7	51,12 ^{bcABC} ±0,29	3,12 ^{bABCD} ±0,10	0,859 ^{aA} ±0,002	5,12 ^{aBC} ±0,05
T105	F1	49,70 ^{bAB} ±4,32	2,96 ^{abcABC} ±1,84	0,789 ^{bD} ±0,078	5,28 ^{abB} ±0,35
	F2	54,39 ^{bA} ±4,84	3,73 ^{aA} ±1,00	0,803 ^{abD} ±0,084	4,84 ^{bBC} ±0,40
	F3	57,02 ^{aA} ±1,59	2,23 ^{bcE} ±0,03	0,794 ^{abDE} ±0,011	5,15 ^{abB} ±0,08
	F4	54,33 ^{bAB} ±5,04	3,54 ^{abAB} ±0,25	0,898 ^{aD} ±0,021	5,69 ^{aAB} ±0,70
	F5	55,80 ^{bA} ±2,74	2,07 ^{cEF} ±0,33	0,800 ^{abA} ±0,0083	5,31 ^{abBCD} ±0,22
	F6	56,80 ^{bA} ±5,02	2,75 ^{abcD} ±0,22	0,716 ^{bD} ±0,003	4,93 ^{abB} ±0,01
	F7	55,12 ^{bAB} ±5,19	3,41 ^{abcABC} ±0,23	0,815 ^{abA} ±0,072	5,27 ^{abBC} ±0,18
T120	F1	50,77 ^{aA} ±3,82	2,85 ^{aABC} ±1,79	0,810 ^{aD} ±0,079	5,46 ^{aAB} ±0,56
	F2	57,15 ^{aA} ±6,71	2,73 ^{aB} ±0,07	0,828 ^{aD} ±0,067	4,47 ^{bc} ±0,71
	F3	59,85 ^{aA} ±1,71	2,33 ^{aE} ±0,89	0,769 ^{aE} ±0,051	5,17 ^{abB} ±0,11
	F4	55,22 ^{aA} ±5,07	3,56 ^{aAB} ±1,18	0,827 ^{aE} ±0,042	5,02 ^{abC} ±0,18
	F5	56,46 ^{aA} ±1,83	2,29 ^{aDE} ±0,16	0,821 ^{aA} ±0,066	5,38 ^{aBC} ±0,27
	F6	57,88 ^{aA} ±5,69	2,68 ^{aD} ±0,45	0,753 ^{aD} ±0,072	4,97 ^{abB} ±0,18
	F7	55,74 ^{aA} ±5,07	2,68 ^{aCD} ±0,73	0,820 ^{aA} ±0,052	5,48 ^{aAB} ±0,43

T0 = início do processamento, T3, T5 e T7 (período de fermentação), T15 e T30 (período de maturação), T45, T60, T75, T90, T105 e T120 (período de armazenamento a 4°C); F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey (p<0,05). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas para a mesma formulação em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Composição Centesimal

Com relação à composição centesimal (Tabela 7), os resultados encontrados no final do período de maturação - embutidos prontos para consumo - estão de acordo com o Anexo V da Instrução Normativa nº 22 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento de 31 de julho de 2000 (Regulamento técnico de identidade e qualidade de salame), que preconiza umidade (máx.) 40,0%, gordura (máx.) 35,0%, proteína (mín.) 20,0% e carboidratos totais (máx.) 4,0% (BRASIL, 2000). Considerando os ingredientes obrigatórios (mínimo de 60% de carne suína, toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio) e os resultados das características físico-químicas, as diferentes formulações obtidas podem receber a denominação de salame, segundo a legislação brasileira. Cabe destacar que os embutidos prontos para o consumo (T30) exibiram aumento nos teores de cinzas, proteínas e lipídios, em comparação com o tempo inicial (T0), em função da perda de umidade. Por outro lado, a concentração de carboidratos diminuiu no final do período de maturação, refletindo a utilização desses componentes como possível fonte de energia para as culturas iniciadoras.

Del Nobile et al. (2009) analisaram o efeito da substituição de gordura por óleo de oliva extravirgem na composição química de um salame tipo italiano e encontraram os seguintes valores médios para as diferentes formulações: umidade entre 27,50% e 37,40%, lipídios entre 23,6% e 29,84%, proteínas entre 30,88% e 38,48% e, cinzas entre 5,73 e 6,85%. Tais resultados são compatíveis com os valores encontrados no presente estudo, nos produtos prontos para o consumo.

Verificou-se também, como esperado, uma menor concentração de lipídios totais nos embutidos processados com redução de 60% de gordura suína. Nessas formulações a gordura suína foi substituída por óleo de oliva extravirgem, pré-emulsificado com caseinato de sódio (2%), para preservar as características sensoriais e melhorar o perfil de ácidos graxos dos produtos. Consequentemente, o teor calórico das formulações com redução de gordura (T2 a T7) foi inferior ($p < 0,05$). Observou-se ainda um aumento nos teores de cinzas, proteínas e lipídios em função do tempo de armazenamento ($p < 0,05$), em decorrência da redução de umidade dos salames.

Tabela 7. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) para composição centesimal (g/100g) e teor calórico (kcal) das diferentes formulações no início do estudo (T0), final do período de maturação (T30) e final do período de armazenamento (T120).

		Cinzas	Proteínas	Lipídios	Umidade	Carboidratos	Calorias
T0	F1	1,05 ^{aC} ±0,27	16,60 ^{abB} ±0,81	9,71 ^{aB} ±0,43	60,51 ^{bA} ±0,24	12,13 ^{abA} ±0,88	202,31 ^{aC} ±3,21
	F2	1,16 ^{aC} ±0,03	17,15 ^{abC} ±0,60	3,14 ^{bC} ±0,23	65,66 ^{aA} ±0,69	12,89 ^{abA} ±0,16	148,42 ^{bcC} ±3,98
	F3	1,11 ^{aC} ±0,02	17,12 ^{abB} ±0,59	3,06 ^{bC} ±0,29	65,76 ^{aA} ±0,71	12,96 ^{abA} ±1,05	147,83 ^{bcC} ±2,45
	F4	1,03 ^{aC} ±0,02	16,04 ^{bb} ±1,25	2,78 ^{bC} ±0,60	65,17 ^{aA} ±1,06	14,98 ^{aA} ±0,60	149,13 ^{bb} ±6,64
	F5	1,24 ^{aC} ±0,18	18,45 ^{aC} ±0,36	2,26 ^{bC} ±0,45	66,83 ^{aA} ±0,42	11,22 ^{bA} ±1,25	139,05 ^{cC} ±1,92
	F6	1,08 ^{aC} ±0,01	18,48 ^{aB} ±0,99	2,95 ^{bC} ±0,10	65,63 ^{aA} ±0,59	11,86 ^{bA} ±1,63	147,89 ^{bcC} ±2,14
	F7	1,16 ^{aC} ±0,01	18,32 ^{abB} ±1,09	2,95 ^{bC} ±0,10	65,59 ^{aA} ±0,43	11,98 ^{abA} ±1,49	147,77 ^{bcC} ±1,78
T30	F1	3,27 ^{CB} ±0,14	28,77 ^{CA} ±1,96	31,34 ^{aA} ±2,85	33,16 ^{abB} ±1,23	3,46 ^{aC} ±0,27	410,99 ^{aB} ±11,55
	F2	6,00 ^{BB} ±0,28	31,19 ^{bcB} ±2,51	24,47 ^{bA} ±0,81	34,61 ^{aB} ±2,32	3,73 ^{aC} ±0,41	357,65 ^{bB} ±12,91
	F3	6,50 ^{abB} ±0,29	36,11 ^{aA} ±0,37	21,86 ^{CB} ±0,55	31,62 ^{bb} ±1,03	3,91 ^{aC} ±0,28	356,84 ^{bB} ±5,10
	F4	6,17 ^{BB} ±0,03	35,53 ^{aA} ±1,10	20,80 ^{CB} ±1,10	33,84 ^{abB} ±2,14	3,66 ^{aC} ±0,33	366,51 ^{abA} ±54,97
	F5	6,96 ^{abB} ±0,96	32,08 ^{bcB} ±3,59	23,00 ^{bcB} ±1,11	33,91 ^{abB} ±1,61	4,05 ^{aC} ±1,66	349,79 ^{bB} ±10,31
	F6	7,49 ^{aB} ±1,04	34,42 ^{abA} ±0,46	22,36 ^{bcB} ±1,09	31,90 ^{abB} ±1,23	3,94 ^{aC} ±0,34	354,23 ^{bB} ±8,03
	F7	6,38 ^{BB} ±0,22	33,65 ^{abB} ±0,70	22,93 ^{bcB} ±0,93	33,16 ^{abB} ±0,50	3,89 ^{aC} ±0,29	356,53 ^{bB} ±4,84
T120	F1	6,05 ^{BA} ±0,56	29,66 ^{CA} ±0,17	33,38 ^{aA} ±0,26	26,10 ^{aC} ±0,67	4,81 ^{BB} ±0,87	438,33 ^{aA} ±5,73
	F2	9,56 ^{aA} ±0,16	41,22 ^{aA} ±0,50	23,43 ^{dB} ±0,62	20,60 ^{dcC} ±0,12	6,26 ^{aB} ±0,34	391,53 ^{dA} ±2,96
	F3	9,39 ^{aA} ±0,16	38,71 ^{abA} ±5,02	25,08 ^{bcA} ±1,55	20,12 ^{cC} ±0,25	6,70 ^{aB} ±0,26	407,36 ^{bA} ±8,57
	F4	9,45 ^{aA} ±0,18	34,62 ^{bcA} ±0,49	25,16 ^{bcC} ±0,37	23,80 ^{bC} ±0,35	6,97 ^{aB} ±0,26	392,77 ^{cdA} ±1,51
	F5	9,84 ^{aA} ±0,13	36,82 ^{aBC} ±0,13	24,43 ^{cdA} ±0,34	21,72 ^{cdC} ±0,20	7,19 ^{aB} ±0,39	395,88 ^{bcdA} ±1,90
	F6	9,49 ^{aA} ±0,34	33,99 ^{bcA} ±2,95	26,91 ^{BA} ±1,00	22,78 ^{bcC} ±1,10	6,83 ^{aB} ±0,19	405,50 ^{bcA} ±1,58
	F7	9,60 ^{aC} ±0,25	35,75 ^{abcA} ±1,88	24,26 ^{cdA} ±1,18	23,62 ^{bC} ±0,26	6,76 ^{aB} ±0,56	388,41 ^{dA} ±5,64

T0 = início do processamento, T3, T5 e T7 (período de fermentação), T15 e T30 (período de maturação), T45, T60, T75, T90, T105 e T120 (período de armazenamento a 4°C F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey (p<0,05). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas para a mesma formulação em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Cor instrumental

De acordo com os resultados apresentados na Figura 6 observamos um decréscimo de L^* para todas as formulações que tiveram redução de gordura animal e adição de óleo de oliva, sendo que para a formulação controle (F1, sem redução de gordura) não houve diferença estatística para esse parâmetro comparando-se o T0 com o T120. A redução do valor de L^* indica que o embutido encontra-se mais escuro do que no início do processamento, provavelmente em função da concentração de sólidos no produto por desidratação, ou seja, os embutidos perdem água e sofrem escurecimento (PEREZ-ALVAREZ et al., 1999; RAMOS; GOMIDE, 2007). Os pigmentos mioglobina e nitrosomioglobina formados são concentrados de acordo com a perda água, conferindo cor vermelha mais escura ao salame. Outra possível explicação para redução de L^* seria a substituição de gordura animal por óleo vegetal. Mora-Galego et al. (2013) verificaram redução no parâmetro L^* em função da substituição parcial da gordura animal por óleo de girassol. Esse resultado estaria relacionado ao fato da gordura animal ter uma cor branca visível, conferindo maior luminosidade ao produto, ao contrário do óleo de girassol que é translúcido.

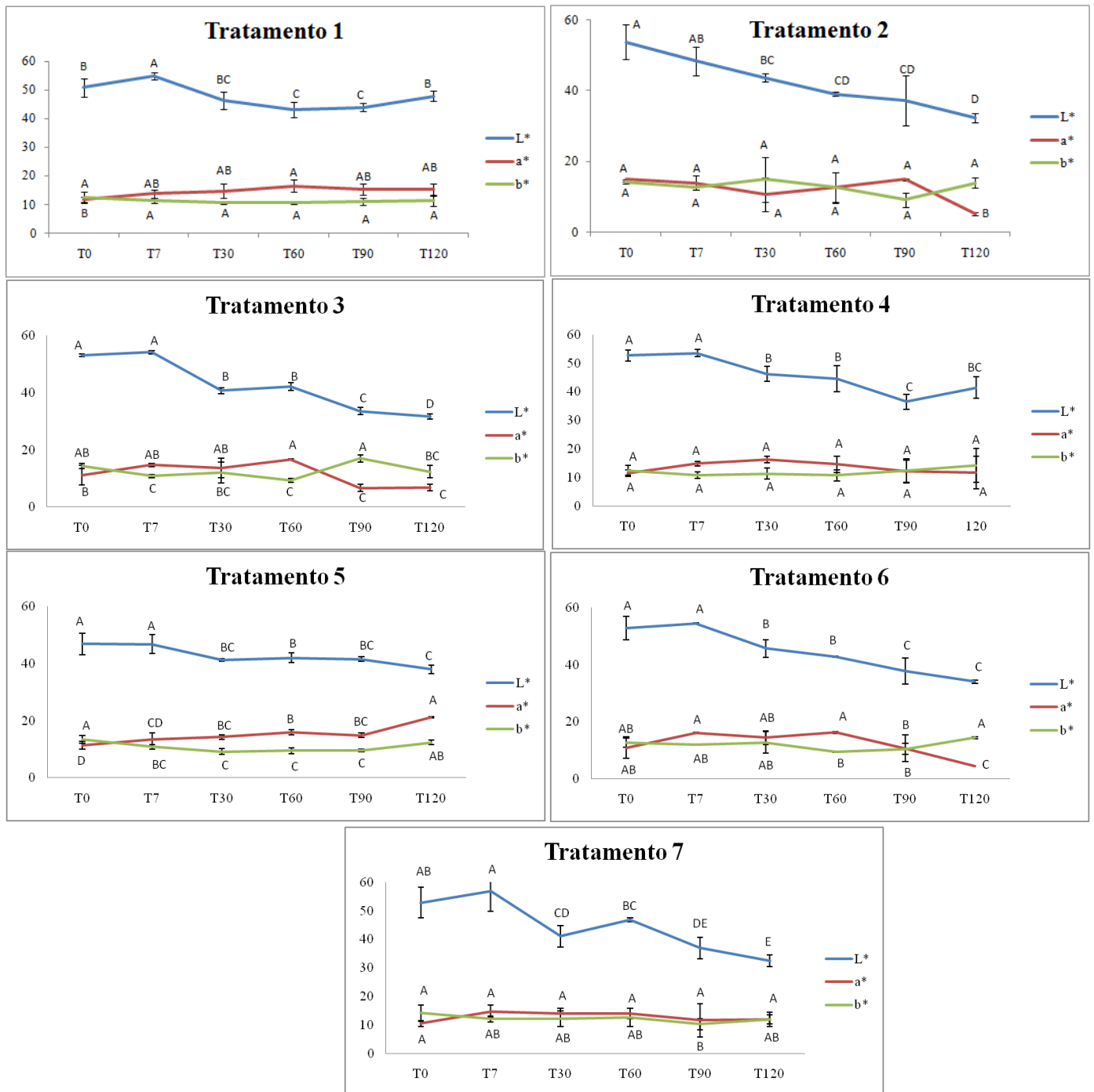
A intensidade de vermelho (a^*) exibiu aumento, apenas para a formulação F5 até o final do período de armazenamento (T120). As formulações F2, F3 e F6 apresentaram redução, enquanto F1, F4 e F7 não apresentaram diferença estatística no mesmo período para a^* , e esse efeito está relacionado ao processo de cura e maturação dos embutidos (RAMOS; GOMIDE, 2007). O processo de cura consiste no tratamento das carnes com sal, nitrito, açúcar, temperos e outros ingredientes, com o objetivo de preservar o produto, desenvolver e fixar cor, sabor, aromas e melhoria de rendimento (JUDGE; ALBERLE; FORREST, 1989). O nitrito é utilizado para preservar o aroma, prevenir a formação de *warmed over flavour* (sabor de requentado), inibir a multiplicação de microrganismos e conferir e fixar a cor rósea vermelha, característica de produtos cárneos. O nitrito, após conversão a óxido nítrico, se combina com a mioglobina, resultando na formação da nitrosomioglobina - composto de coloração vermelha, característica de produtos cárneos curados. A

cor final dos produtos curados depende de uma concentração adequada de sais de cura e de mioglobina (TERRA, 1998; ZANARDI et al., 2002).

Considerando o exposto acima, as formulações com redução de gordura e sais de cura deveriam apresentar menores valores de L^* e maiores valores de a^* no final do processo. A redução dos valores de L^* e o aumento dos valores de a^* com a maturação são consistentes com os resultados reportados por Elias et al. (2003), que encontraram menores valores de L^* (38,75) e maiores valores de a^* (16,43) para embutidos maturados por 30 dias. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo não confirmaram nossa hipótese. Vale salientar que a falta de homogeneidade em relação à distribuição de gordura nas peças, característica típica do produto, pode contribuir para a variação dos parâmetros de cor, observada durante o período de análise.

A intensidade de amarelo (b^*) não apresentou variação significativa, comparando-se os tempos iniciais e finais do estudo (T_0 e T_{120}). A variação nesse parâmetro em produtos cárneos fermentados, resulta, provavelmente, do consumo de oxigênio pelos microrganismos fermentadores durante sua fase de crescimento exponencial, com redução da oximioglobina, a qual contribui para a coloração amarela (PÉREZ-ALVAREZ et al., 1999). Outros autores sugerem que os microrganismos produzem metabólitos que induzem a oxidação da carne e gordura (DEMEYER; VERPLAETSE; GISTELINCK, 1986; SARASIBAR; SANCHEZ; BELLO, 1989; ZERT, 1980), contribuindo para redução deste parâmetro, fato não observado no presente estudo.

Figura 6. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) de L*, a* e b* para as diferentes formulações.



T0 = início do processamento, T7 = fim do período de fermentação, T30 = fim do período de maturação, T60, T90, 120 = período de armazenamento a 4°C. Análise entre tempos: Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E. faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey ($p < 0,05$). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas para a mesma formulação em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Oxidação lipídica

Os resultados referentes à oxidação lipídica são apresentados na Tabela 8.

O malonaldeído (MDA) é o principal produto secundário da oxidação lipídica que reage com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). No entanto, outros compostos presentes no produto como proteínas e nitrito também podem reagir com o TBA, interferindo nos resultados obtidos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Tabela 8. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) de TBARS (mg/kg) para as diferentes formulações e etapas de processamento.

	T0	T7	T30	T60	T90	T120
F1	2,30 ^{aF} $\pm$ 0,27	3,61 ^{aE} $\pm$ 0,24	5,27 ^{aD} $\pm$ 0,22	6,27 ^{aC} $\pm$ 0,20	8,53 ^{aB} $\pm$ 0,26	9,44 ^{aA} $\pm$ 0,30
F2	1,12 ^{cD} $\pm$ 0,10	2,35 ^{bcC} $\pm$ 0,42	4,85 ^{abB} $\pm$ 0,10	5,67 ^{bA} $\pm$ 0,25	5,03 ^{cdB} $\pm$ 0,31	4,61 ^{bB} $\pm$ 0,24
F3	1,42 ^{bcD} $\pm$ 0,37	2,41 ^{bcC} $\pm$ 0,26	4,42 ^{bcB} $\pm$ 0,18	5,41 ^{bcA} $\pm$ 0,21	5,37 ^{bcA} $\pm$ 0,26	4,65 ^{bB} $\pm$ 0,28
F4	1,48 ^{bcD} $\pm$ 0,18	2,40 ^{bcC} $\pm$ 0,19	4,44 ^{bcB} $\pm$ 0,27	5,49 ^{bcA} $\pm$ 0,38	5,52 ^{bcA} $\pm$ 0,24	4,39 ^{bB} $\pm$ 0,33
F5	1,55 ^{bdD} $\pm$ 0,27	2,09 ^{cC} $\pm$ 0,08	4,16 ^{cb} $\pm$ 0,28	5,15 ^{cA} $\pm$ 0,19	4,78 ^{dA} $\pm$ 0,48	3,77 ^{cb} $\pm$ 0,33
F6	1,24 ^{bcE} $\pm$ 0,17	2,63 ^{bdD} $\pm$ 0,20	4,22 ^{cC} $\pm$ 0,36	5,51 ^{bcA} $\pm$ 0,32	5,58 ^{bcA} $\pm$ 0,37	4,83 ^{bB} $\pm$ 0,08
F7	1,24 ^{bcD} $\pm$ 0,18	2,35 ^{bcC} $\pm$ 0,05	4,19 ^{cb} $\pm$ 0,17	5,49 ^{bcA} $\pm$ 0,23	5,69 ^{ba} $\pm$ 0,25	4,45 ^{bB} $\pm$ 0,38

T0 = início do processamento, T7 = fim do período de fermentação, T30 = fim do período de maturação, T60, T90, T120 = período de armazenamento a 4°C; F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E. faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey ($p < 0,05$). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha (mesma formulação) em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No presente estudo, a formulação F1, obtida sem redução no teor de gordura, apresentou oxidação lipídica mais acentuada em comparação com as demais formulações, em todos os tempos de análise ($p < 0,05$). A substituição parcial de gordura animal por óleo de oliva, rico em ácidos graxos insaturados, não influenciou negativamente o processo oxidativo dos embutidos. A adição de

ingredientes tais como alho e pimenta podem interferir positivamente na estabilidade lipídica, uma vez que estes ingredientes possuem compostos com atividade antioxidante (LAI *et al.*, 1991).

Determinadas cepas de bactérias lácticas são capazes de inibir a oxidação de lipídios, embora o mecanismo exato envolvido em tal efeito não seja conhecido (INOUE *et al.*, 1998). Os resultados evidenciaram que os embutidos fermentados com *Enterococcus faecium* CRL 183 apresentaram as menores médias de oxidação no final do tempo de armazenamento (T120), indicando que esta cepa probiótica pode exercer um efeito protetor em relação à formação de compostos indesejáveis no produto. Os resultados obtidos foram mais evidentes para a formulação com redução de nitrito (T5), sugerindo que a concentração desse aditivo pode ter interferido nos resultados obtidos.

Observa-se que a partir do T90 houve uma redução no índice de oxidação lipídica em todas as formulações, com exceção da formulação F1, e, supõe-se que o pH, a umidade e a atividade de água (*A_w*) sejam responsáveis por esse efeito, mantendo o sistema impróprio para o aumento da oxidação (KAREL; YOUNG, 1981). Além disso, esta diminuição pode ser atribuída às reações do malonaldeído com proteínas durante o período de armazenamento, embora o malonaldeído seja um produto secundário da oxidação de ácidos graxos polinsaturados (MELTON, 1993 citado por MARANGONI, 2007).

Textura Instrumental

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados do perfil de análise de textura.

Os parâmetros dureza e gomosidade exibiram aumento com o decorrer dos tempos de análise, enquanto a mastigabilidade aumentou até o fim do período de maturação (T30), para todas as formulações. A elasticidade dos embutidos foi reduzida no mesmo período e o parâmetro coesividade se manteve sem grandes alterações até o T90.

Somente no último tempo de análise, T120, não foi possível realizar a determinação do perfil de textura das formulações com redução de gordura, indicando que a sua dureza estava acima da

força máxima que o equipamento pode aplicar à amostra. Esse resultado sugere que a substituição parcial de gordura animal por óleo de oliva resulta em aumento no parâmetro dureza, fato que não comprometeu a aceitação hedônica global das amostras.

Observamos que no último tempo de leitura (T90), entre as formulações com redução de gordura, a F5 foi a que apresentou a menor média para dureza ($p < 0,05$), indicando que foi necessária uma menor força, contribuindo assim para a qualidade do produto.

Andrés; Zaritzky; Califano (2006) avaliaram o efeito de diferentes níveis de gordura na qualidade de embutidos de frango e concluíram que os valores de dureza aumentam com o armazenamento (4°C). Resultados semelhantes foram relatados por Candogan e Kolsarici (2003a) para salsichas com redução de gordura. Este aumento na dureza ocorre, provavelmente, devido à perda de água do produto durante a refrigeração. Gomosidade e mastigabilidade são dependentes da variável dureza, o que explicaria um aumento nesses parâmetros em função do aumento da dureza dos embutidos. Pelo fato do embutido ficar mais duro com o decorrer do tempo de armazenamento, há uma redução da sua elasticidade.

Tabela 9. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) obtidos no teste TPA (Texture Profile Analysis), para os parâmetros de dureza (N), coesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade, para as diferentes formulações e etapas de processamento.

Tempo/ Atributo	Formulações						
	1	2	3	4	5	6	7
T0							
Dureza	1,67 ^{bE} ±0,18	1,78 ^{abD} ±0,09	2,12 ^{aD} ±0,06	1,93 ^{abD} ±0,20	2,08 ^{abD} ±0,33	1,90 ^{abD} ±0,12	2,00 ^{aD} ±0,16
Coesividade	0,53 ^{abBC} ±0,04	0,57 ^{aA} ±0,04	0,48 ^{bB} ±0,03	0,51 ^{abA} ±0,05	0,54 ^{abB} ±0,03	0,56 ^{aA} ±0,03	0,51 ^{cbB} ±0,03
Elasticidade	1,99 ^{aA} ±0,41	1,75 ^{abA} ±0,14	1,45 ^{bA} ±0,14	1,44 ^{bA} ±0,12	1,36 ^{bA} ±0,25	1,67 ^{abA} ±0,23	1,56 ^{bA} ±0,09
Gomosidade	0,89 ^{bF} ±0,16	0,99 ^{abD} ±0,10	1,03 ^{abE} ±0,05	0,99 ^{bD} ±0,17	1,15 ^{aE} ±0,16	1,01 ^{abE} ±0,06	1,04 ^{abE} ±0,04
Mastigabilidade	1,72 ^{bcF} ±0,08	1,99 ^{aD} ±0,10	1,47 ^{cdE} ±0,11	1,41 ^{dD} ±0,19	1,57 ^{bcdD} ±0,06	1,51 ^{dD} ±0,14	1,73 ^{bD} ±0,16
T7							
Dureza	9,44 ^{bD} ±1,74	13,86 ^{aC} ±1,83	13,42 ^{aC} ±0,79	11,57 ^{abC} ±1,58	11,25 ^{abC} ±2,17	12,71 ^{aC} ±0,19	12,79 ^{aC} ±1,04
Coesividade	0,61 ^{bA} ±0,05	0,50 ^{cdA} ±0,05	0,54 ^{bcA} ±0,02	0,43 ^{dB} ±0,02	0,83 ^{aA} ±0,08	0,49 ^{cdB} ±0,03	0,46 ^{cdC} ±0,02
Elasticidade	1,23 ^{bb} ±0,07	1,32 ^{bb} ±0,12	1,32 ^{bA} ±0,18	1,26 ^{bb} ±0,03	1,17 ^{bb} ±0,06	1,29 ^{bb} ±0,05	1,56 ^{aA} ±0,13
Gomosidade	3,61 ^{dE} ±0,25	5,83 ^{cd} ±0,52	6,54 ^{bcd} ±0,49	6,78 ^{bcC} ±1,20	8,70 ^{aD} ±1,07	7,28 ^{bD} ±0,14	6,51 ^{bcD} ±0,27
Mastigabilidade	2,62 ^{dE} ±0,16	3,71 ^{abC} ±0,08	3,92 ^{aD} ±0,37	3,46 ^{bcC} ±0,14	3,44 ^{bcC} ±0,40	3,16 ^{cC} ±0,16	3,10 ^{cC} ±0,05
T30							
Dureza	26,58 ^{bc} ±1,46	47,04 ^{aB} ±10,25	45,39 ^{aB} ±9,83	54,78 ^{aB} ±6,61	47,62 ^{aB} ±7,54	50,04 ^{aB} ±7,17	47,91 ^{aB} ±9,77
Coesividade	0,57 ^{aAb} ±0,03	0,54 ^{abA} ±0,02	0,54 ^{abA} ±0,04	0,51 ^{bA} ±0,04	0,54 ^{abB} ±0,02	0,52 ^{bb} ±0,02	0,53 ^{abAB} ±0,02
Elasticidade	1,09 ^{aBC} ±0,04	0,96 ^{bb} ±0,01	0,82 ^{dB} ±0,02	0,84 ^{cdC} ±0,02	0,96 ^{bC} ±0,01	0,87 ^{cC} ±0,02	0,85 ^{cdB} ±0,01
Gomosidade	13,20 ^{bD} ±1,72	23,95 ^{aB} ±3,55	29,05 ^{aB} ±1,86	27,86 ^{aB} ±0,64	26,34 ^{aC} ±4,73	24,89 ^{aC} ±3,57	25,92 ^{aC} ±3,44
Mastigabilidade	5,15 ^{cd} ±0,03	24,25 ^{abA} ±1,30	23,62 ^{bA} ±1,70	25,80 ^{aA} ±1,83	23,46 ^{bA} ±0,52	23,37 ^{bA} ±0,53	24,11 ^{abA} ±0,68
T60							
Dureza	49,06 ^{bb} ±1,48	46,64 ^{bb} ±3,53	46,05 ^{bb} ±3,31	59,54 ^{aAB} ±0,14	56,24 ^{aA} ±2,32	57,43 ^{aA} ±0,84	59,60 ^{aA} ±0,02
Coesividade	0,50 ^{bcC} ±0,02	0,39 ^{dB} ±0,07	0,45 ^{cdB} ±0,02	0,54 ^{abA} ±0,03	0,56 ^{aB} ±0,02	0,57 ^{aA} ±0,01	0,56 ^{aA} ±0,03
Elasticidade	0,85 ^{aC} ±0,01	0,67 ^{bD} ±0,15	0,84 ^{aB} ±0,02	0,84 ^{aC} ±0,01	0,84 ^{aC} ±0,01	0,84 ^{aC} ±0,03	0,84 ^{aB} ±0,01
Gomosidade	24,59 ^{cC} ±1,01	18,41 ^{dC} ±3,47	22,44 ^{cdC} ±1,94	30,71 ^{bb} ±3,67	31,17 ^{bb} ±2,33	37,60 ^{aB} ±0,39	34,19 ^{abB} ±0,22
Mastigabilidade	11,14 ^{aC} ±0,34	12,01 ^{bcB} ±1,37	14,47 ^{aB} ±1,49	11,56 ^{cb} ±0,29	11,63 ^{cb} ±1,02	12,66 ^{abcB} ±1,42	13,62 ^{abB} ±0,88
T90							
Dureza	50,79 ^{aB} ±0,67	60,14 ^{abA} ±0,56	61,33 ^{abA} ±0,98	60,49 ^{abA} ±0,63	55,44 ^{CA} ±3,27	62,72 ^{aA} ±1,09	59,41 ^{bA} ±0,28
Coesividade	0,56 ^{aAB} ±0,03	0,53 ^{abA} ±0,02	0,54 ^{abA} ±0,02	0,54 ^{abA} ±0,03	0,55 ^{abB} ±0,01	0,52 ^{bb} ±0,01	0,54 ^{abAB} ±0,01
Elasticidade	0,84 ^{abC} ±0,01	0,85 ^{aC} ±0,01	0,83 ^{abB} ±0,01	0,82 ^{bC} ±0,02	0,84 ^{abC} ±0,01	0,82 ^{bC} ±0,02	0,84 ^{abB} ±0,01

Continuação Tabela 9

Gomosidade	33,51 ^{dB} ±1,73	56,43 ^{bcA} ±3,82	54,75 ^{cA} ±2,06	55,36 ^{bcA} ±0,68	59,11 ^{bA} ±2,80	56,36 ^{bcA} ±1,25	67,83 ^{aA} ±0,82
Mastigabilidade	12,81 ^{aB} ±0,15	12,43 ^{bcB} ±0,25	12,40 ^{bcC} ±0,31	12,37 ^{bcB} ±0,35	12,15 ^{cB} ±0,36	12,87 ^{abB} ±0,21	13,31 ^{aB} ±0,50
T120							
Dureza	65,30 ^A ±0,86	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Coesividade	0,62 ^A ±0,01	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Elasticidade	0,95 ^{BC} ±0,01	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Gomosidade	48,44 ^A ±1,84	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Mastigabilidade	13,76 ^A ±0,29	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

T0 = início do processamento, T7 = fim do período de fermentação, T30 = fim do período de maturação, T60, T90 e T120 = período de armazenamento a 4°C; F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma linha, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey (p<0,05). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna (mesma formulação), em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Aminas bioativas

Considerando o número de grupamento amina, as aminas bioativas podem ser classificadas em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, serotonina, triptamina, putrescina e cadaverina) ou poliaminas (espermina, espermidina e agmatina) (GLÓRIA, 2005) .

Níveis elevados de aminas bioativas foram encontrados em diversos tipos de embutidos como fuet, salchichón, chorizo e sobrasada, salames egípcios, canadenses, finlandeses, americanos e italianos (BOVER-CID et al., 2000a; COISSON et al., 2004; EEROLA et al., 1997; HERNÁNDEZ-JOVER et al., 1997a; SUZZI; GARDINI, 2003). A formação de aminas bioativas requer: presença de aminoácidos livres e de microrganismos com atividade da enzima aminoácido descarboxilase, além de condições que favoreçam a multiplicação de tais microrganismos. Entre as espécies envolvidas na formação de aminas bioativas estão: *Escherichia* spp.; *Enterobacter* spp.; *Salmonella* spp.; *Lactobacillus* spp.; *Leuconostoc* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Proteus* spp.; *Pediococcus* spp.; *Streptococcus* spp.; *Micrococcus* spp. Esses microrganismos podem pertencer à microbiota natural do alimento ou serem incorporados durante as diferentes etapas de produção, enfatizando a importância da seleção das culturas iniciadoras utilizadas em processos fermentativos. A produção de aminas é influenciada pelo pH, temperatura, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e cofatores (GLÓRIA, 2005) .

As condições de produção de salame são favoráveis à formação de aminas, devido à ação de enzimas endógenas e presença de microrganismos com atividade proteolítica, gerando aminoácidos que favorecem a atividade descarboxilase (LAPA-GUIMARÃES, 2005). Geralmente, são utilizadas como culturas iniciadoras nesse tipo de produto bactérias lácticas, que não são patogênicas, mas podem produzir aminas bioativas. Tiramina pode ser produzida por cepas de *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Carnobacterium* spp. (BOVER-CID et al., 2000b; MONTEL, MASSON; TALON, 1999; SUZZI; GARDINI, 2003). Algumas cepas de *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp. podem produzir também histamina (SUZZI; GARDINI, 2003), enquanto a produção de feniletilamina foi observada por cepas de *Enterococcus* spp.

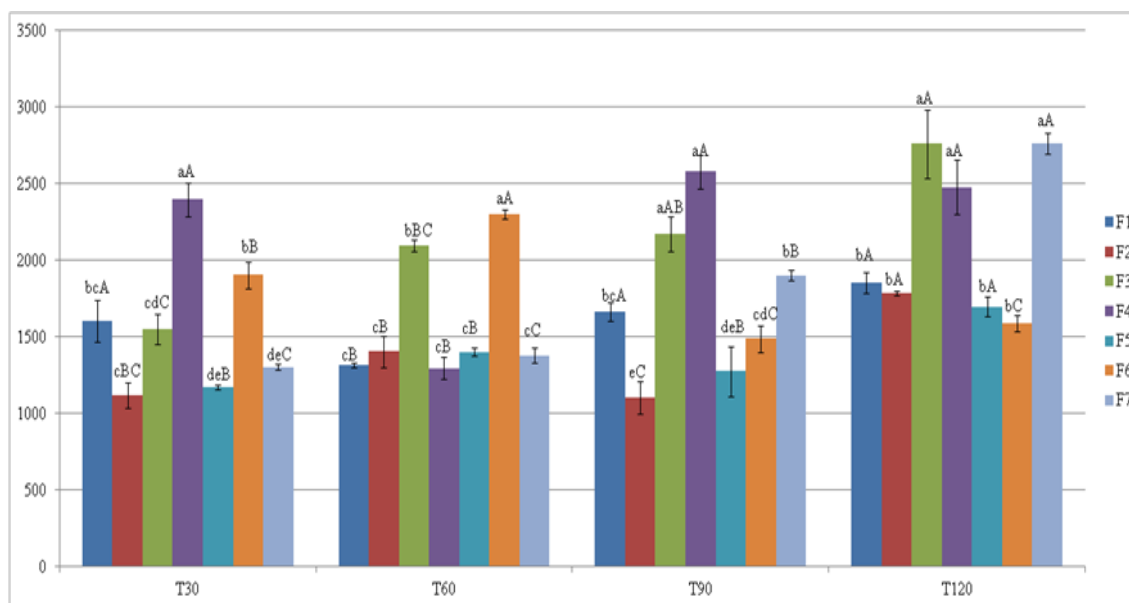
(BOVER-CID et al., 2000b). Uma alternativa viável para impedir a multiplicação de bactérias contaminantes e reduzir os teores de amins bioativas em produtos cárneos é a utilização de culturas iniciadoras específicas, sendo importante analisar o potencial da cepa em formar e metabolizar tais compostos (AYHAN; KOLSARICI; ÖZKAN, 1999; BOVER-CID et al., 2000b; HERNÁNDEZ-JOVER et al., 1997b; SUZZI; GARDIN, 2003).

Na Figura 7 são apresentados os resultados para o total de amins bioativas encontrados nas diferentes formulações, em ppm, nos tempos 30, 60, 90 e 120 dias.

Observa-se que no produto pronto para o consumo (T30), as formulações com redução de nitrito e nitrato e fermentadas com bactérias probióticas (F5 e F7) não diferiram estatisticamente entre si e apresentaram menores concentrações de amins bioativas quando comparadas aos seus análogos sem redução de sais de cura. Além disso, também exibiram menores valores totais de amins que o produto controle (F1). Após 30 dias de armazenamento (T60), F3 e F6 apresentaram as maiores concentrações desses compostos e as demais formulações não diferiram entre si ($p < 0,05$). No T90 as formulações F2 e F5 exibiram as menores médias para amins bioativas totais, diferindo da formulação F1 (controle) ($p < 0,05$). No final do período de armazenamento (T120) os maiores teores de amins totais foram verificados para as formulações F3, F4 e F7, sendo que os demais embutidos fermentados não diferiram entre si ($p < 0,05$).

A análise entre tempos evidenciou um aumento nas concentrações totais de amins bioativas para as formulações 3, 5 e 7 e uma flutuação nos níveis das demais formulações. A elevação no teor de amins durante o armazenamento era esperada, pois o processo de obtenção do embutido cárneo fermentado inclui etapas que favorecem a formação de tais compostos como: multiplicação de microrganismos, proteólise (liberando aminoácidos livres) e temperatura de fermentação e maturação (25 a 15°C) que facilita a ação das enzimas descarboxilases (GLÓRIA, 2005).

Figura 7. Concentrações médias ($\pm$ desvios padrões) de aminas bioativas (ppm) para as diferentes formulações em estudo.



T30 = fim do período de maturação, T60, T90 e T120 = período de armazenamento a 4°C; F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E. faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey ($p < 0,05$). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Tabela 10 observa-se a contribuição de cada amina bioativa nas diferentes formulações e tempos de análise.

Tiramina, putrescina e cadaverina foram as aminas com maior prevalência em todas as formulações. A triptamina foi detectada em baixas concentrações e exibiu flutuações durante o período de análise, estando ausente na formulação F5, em todos os tempos avaliados. Com exceção da formulação F6, a feniletilamina esteve ausente nos produtos avaliados, durante o período armazenamento (T60 a T120).

A histamina é uma amina potencialmente tóxica, cuja ingestão em níveis elevados, combinada ou não com a deficiência de enzimas que metabolizam tais substâncias, pode resultar em efeitos indesejáveis à saúde. Histamina, tiramina e fenilalanina são as aminas mais relacionadas às

intoxicações alimentares (GLORIA, 2005). No presente estudo a concentração de histamina variou durante os períodos de análise, sendo que a formulação F4 (sem redução de sais de cura e fermentado com *E. faecium* CRL 183), F3 (com redução de sais de cura e fermentado com culturas tradicionais) e F7 (com redução de sais de cura e fermentado com *L.acidophilus* CRL 1014) exibiram as maiores concentrações dessa amina até o final do período experimental.

Os sais de cura apresentam efeito antioxidante e inibidor de multiplicação de microrganismos. Dessa forma, esperava-se que as formulações sem redução de nitrito e nitrato exibissem os menores valores de aminas bioativas. Esse efeito foi observado somente para as formulações fermentadas com culturas tradicionais (F2 e F3), especialmente durante o período de armazenamento. Entretanto, não foi possível associar claramente o efeito da redução de nitrito e o teor de aminas para as formulações com adição de probióticos, pois alguns com redução de sais de cura apresentaram valores inferiores de diferentes aminas, quando comparados aos análogos sem redução de nitrito e nitrato.

Como constatado em relação ao teor total, a formulação F5 (redução de sais de cura e fermentado com *E. faecium* CRL 183) exibiu o melhor perfil de aminas bioativas no final do período de armazenamento, com ausência de triptamina, feniletilamina, espermidina e histamina e os menores valores de cadaverina. Assim sendo, o emprego do *E.faecium* CRL 183 como cultura starter, juntamente com a redução do teor de sais de cura, mostrou-se promissor na obtenção de um produto mais seguro e mais interessante do ponto de vista nutricional.

A síntese de histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina ocorre através da descarboxilação de aminoácidos precursores (enzimas aminoácido descarboxilases) ou via aminação de aldeídos (enzimas aldeído transaminases). A produção de poliaminas é um processo mais complexo, que exige a presença de putrescina como intermediário para a produção de espermidina e espermina (BARDÓCZ, 1995).

Aminas bioativas presentes em alimentos são metabolizadas pelo organismo humano via oxidação e acetilação, resultando em compostos com diferentes funções biológicas. Alguns

microrganismos também são capazes de metabolizar histamina e tiramina através de reações de acetilação ou pela ação de enzimas diamino oxidase, resultando em alterações nos teores de tais aminas (GLÓRIA, 2005).

Frente ao exposto acima, as flutuações nos níveis de algumas aminas durante o período experimental - que prejudicaram relacionar claramente os teores de gordura e nitrito e o tipo de cepa utilizada no processo fermentativo, com os resultados observados - podem ter ocorrido em função de: 1) presença de aldeídos, resultantes da oxidação de gorduras, e que servem de substratos para as enzimas aldeído transaminases, envolvidas na síntese de histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina; 2) catabolismo de histamina e tiramina por bactérias, contaminantes ou não, presentes no produto durante o período de armazenamento.

Cabe destacar também que as amostras de salames foram transportadas para a Itália, onde foram realizadas todas as análises de aminas bioativas, via FEDEX. Apesar de terem sido tomadas todas as precauções para que o transporte fosse feito de forma correta (amostras congeladas), não foi possível afirmar que as condições ideais de transporte das amostras foram respeitadas durante todo o trajeto. Considerando a importância da temperatura na produção de aminas (enzimas aminoácido descarboxilases são mais ativas entre 10 e 30°C), pequenas variações podem ter influenciado os resultados.

Tabela 10. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) das aminas bioativas (ppm) para as diferentes formulações e etapas de processamento.

Tempo/ Atributo	Formulações						
T30	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
TRY	11,3 ^{cB} $\pm$ 0,0	66,3 ^{bA} $\pm$ 8,9	48,3 ^{bA} $\pm$ 1,3	89,4 ^{aA} $\pm$ 14,7	Nd	63,2 ^{abA} $\pm$ 5,0	Nd
PHEN	Nd	Nd	32,6 ^h $\pm$ 12,1	Nd	Nd	Nd	Nd
PUT	968,4 ^{aA} $\pm$ 62,8	479,1 ^{bB} $\pm$ 77,4	402,1 ^{bB} $\pm$ 1,4	911,7 ^{aA} $\pm$ 78,7	433,7 ^{bB} $\pm$ 14,9	560,6 ^{bB} $\pm$ 13,4	477,0 ^{bC} $\pm$ 6,0
CAD	229,5 ^{cC} $\pm$ 10,6	92,9 ^{dB} $\pm$ 5,0	444,8 ^{bB} $\pm$ 3,2	462,0 ^{bB} $\pm$ 63,8	104,2 ^{cB} $\pm$ 1,6	678,7 ^{aB} $\pm$ 7,5	259,9 ^{cC} $\pm$ 3,6
HIS	Nd	105,5 ^{dA} $\pm$ 9,3	171,4 ^{bcAB} $\pm$ 14,2	236,4 ^{aB} $\pm$ 5,9	105,0 ^{dA} $\pm$ 0,6	153,5 ^{bA} $\pm$ 4,3	121,8 ^{cdC} $\pm$ 6,3
TIRAM	272,0 ^{cBC} $\pm$ 5,4	240,7 ^{cB} $\pm$ 2,6	306,0 ^{cA} $\pm$ 2,1	570,2 ^{aA} $\pm$ 13,4	288,3 ^{cB} $\pm$ 0,4	384,0 ^{bA} $\pm$ 18,8	300,4 ^{cC} $\pm$ 14,0
SPD	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
SPM	137,2 ^{bA} $\pm$ 7,3	142,1 ^{abB} $\pm$ 1,5	142,2 ^{abB} $\pm$ 2,9	126,6 ^{cB} $\pm$ 5,7	153,6 ^{aA} $\pm$ 4,4	150,0 ^{abA} $\pm$ 6,5	141,8 ^{abC} $\pm$ 1,6
T60							
TRY	96,3 ^{aA} $\pm$ 9,2	70,4 ^{aA} $\pm$ 1,2	62,5 ^{aA} $\pm$ 2,8	Nd	Nd	56,8 ^{aA} $\pm$ 3,4	Nd
PHEN	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	109,0 ^B $\pm$ 2,3	Nd
PUT	435,9 ^{bcC} $\pm$ 45,9	611,5 ^{aA} $\pm$ 37,4	661,0 ^{aAB} $\pm$ 6,1	373,6 ^{cB} $\pm$ 7,9	484,8 ^{bB} $\pm$ 1,4	624,9 ^{aA} $\pm$ 21,9	511,1 ^{bC} $\pm$ 14,5
CAD	478,2 ^{cA} $\pm$ 10,0	108,9 ^{eB} $\pm$ 5,5	634,3 ^{bB} $\pm$ 13,9	311,7 ^{dC} $\pm$ 20,6	270,0 ^{dB} $\pm$ 24,1	793,3 ^{aA} $\pm$ 29,2	286,2 ^{dC} $\pm$ 13,3
HIS	Nd	107,6 ^{cA} $\pm$ 1,8	190,5 ^{aA} $\pm$ 3,0	110,0 ^{cC} $\pm$ 3,4	109,9 ^{cA} $\pm$ 0,3	152,0 ^{bA} $\pm$ 1,6	112,0 ^{cC} $\pm$ 1,5
TIRAM	193,7 ^{dC} $\pm$ 6,2	301,9 ^{cB} $\pm$ 16,4	408,5 ^{aA} $\pm$ 4,1	336,2 ^{abcB} $\pm$ 21,4	355,6 ^{abB} $\pm$ 7,7	395,4 ^{aA} $\pm$ 10,0	313,9 ^{bcC} $\pm$ 17,1
SPD	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
SPM	132,5 ^{dA} $\pm$ 4,7	167,0 ^{abA} $\pm$ 3,9	175,5 ^{aA} $\pm$ 4,7	149,5 ^{cAB} $\pm$ 9,1	155,2 ^{bcA} $\pm$ 2,3	158,0 ^{bcA} $\pm$ 5,1	153,9 ^{bcB} $\pm$ 4,2
T90							
TRY	49,8 ^{aAB} $\pm$ 0,0	52,1 ^{aA} $\pm$ 0,1	Nd	47,3 ^{aAB} $\pm$ 2,0	Nd	Nd	Nd
PHEN	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	75,9 ^C $\pm$ 3,8	Nd
PUT	729,8 ^{bcB} $\pm$ 24,4	591,1 ^{cdA} $\pm$ 5,2	811,8 ^{abA} $\pm$ 56,3	949,9 ^{aA} $\pm$ 73,2	488,6 ^{dB} $\pm$ 60,1	467,1 ^{dC} $\pm$ 22,8	742,9 ^{bB} $\pm$ 9,7
CAD	428,1 ^{bcB} $\pm$ 15,0	102,5 ^{dB} $\pm$ 2,0	721,5 ^{aAB} $\pm$ 157,3	531,3 ^{abB} $\pm$ 48,2	233,5 ^{cdB} $\pm$ 37,8	426,1 ^{bcC} $\pm$ 21,3	332,1 ^{bcB} $\pm$ 6,2
HIS	Nd	Nd	129,6 ^{cB} $\pm$ 17,1	291,9 ^{aA} $\pm$ 9,5	107,8 ^{cA} $\pm$ 3,9	Nd	189,4 ^{abB} $\pm$ 2,5
TIRAM	337,4 ^{cB} $\pm$ 26,4	266,7 ^{cB} $\pm$ 17,4	356,2 ^{bcA} $\pm$ 51,8	561,7 ^{aA} $\pm$ 32,1	297,0 ^{cB} $\pm$ 49,3	353,2 ^{cA} $\pm$ 22,6	468,9 ^{abB} $\pm$ 26,4
SPD	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
SPM	134,3 ^{bA} $\pm$ 2,1	157,8 ^{abAB} $\pm$ 10,2	151,6 ^{abAB} $\pm$ 15,4	155,1 ^{abA} $\pm$ 4,8	152,0 ^{abA} $\pm$ 11,9	164,5 ^{aA} $\pm$ 5,3	169,2 ^{aA} $\pm$ 3,0

Continuação Tabela 10

T120							
TRY	43,2 ^{bAB} ±1,3	40,0 ^{bA} ±0,7	57,8 ^{aA} ±7,2	20,9 ^{cB} ±1,0	Nd	Nd	71,5 ^a ±0,2
PHEN	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	146,3 ^A ±1,4	Nd
PUT	778,5 ^{bcB} ±7,9	551,8 ^{deA} ±17,1	829,7 ^{bcA} ±84,1	895,0 ^{bA} ±104,1	682,2 ^{cdA} ±8,0	482,0 ^{eC} ±17,6	1098,7 ^{aA} ±40,8
CAD	449,0 ^{cdAB} ±14,3	579,7 ^{deA} ±17,1	1103,7 ^{aA} ±112,3	803,8 ^{bA} ±1,3	392,4 ^{cdA} ±8,0	404,0 ^{dC} ±18,5	591,9 ^{cA} ±19,5
HIS	Nd	Nd	173,0 ^{aAB} ±6,5	237,5 ^{aA} ±2,1	Nd	Nd	207,8 ^{bB} ±0,3
TIRAM	441,0 ^{bA} ±38,1	384,9 ^{bA} ±33,1	422,3 ^{bA} ±18,7	386,6 ^{bB} ±26,3	454,9 ^{bA} ±20,8	390,7 ^{bA} ±17,5	618,6 ^{aA} ±116,2
SPD	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
SPM	140,0 ^{bA} ±8,0	164,1 ^{aB} ±6,8	173,9 ^{aA} ±7,5	134,3 ^{bAB} ±12,3	168,8 ^{aA} ±3,7	166,0 ^{aA} ±1,9	171,8 ^{aA} ±3,2

TRY = triptamina, PHEN = feniletilamina, PUT = putrescina, CAD = cadaverina, HIS = histamina, TIRAM = tiramina, SPD = espermidina e SPM = espermina. T30 = fim do período de maturação, T60 e T90 = período de armazenamento a 4°C; F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma linha, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey (p<0,05). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna (mesma formulação), em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Perfil de ácidos graxos

A Tabela 11 apresenta a composição em ácidos graxos das frações de lipídios extraídas das diferentes formulações de embutido cárneo fermentado, em diferentes etapas de processamento. As composições foram normalizadas levando em conta apenas os ácidos graxos identificados. No caso da formulação tradicional (F1), praticamente toda a fração lipídica é proveniente da gordura suína adicionada como ingrediente da formulação, além dos baixos teores presentes nas carnes suína e bovina. Os principais ácidos graxos encontrados nesta formulação no tempo T0 foram o oleico (48,0%), palmítico (25,9%), linoleico (8,3%), além dos ácidos mirístico, palmitoleico e alfa-linolênico que, somados, representam menos de 5,0% do total. Diante disso, sua composição em ácidos graxos foi comparada à composição da gordura suína estipulada pelo Codex Alimentarius (CODEX, 2009) e ainda à composição apresentada por Gunstone e Harwood (2007). De acordo com as fontes mencionadas, a banha suína deve conter entre 35 e 55 % de ácido oleico, de 20 a 30% de ácido palmítico, de 4 a 12% de ácido linoleico e até 8% da soma entre os ácidos mirístico, palmitoleico e alfa-linolênico. Assim, a composição em ácidos graxos da formulação F1 em T0 está de acordo com a literatura.

No decorrer das etapas de produção, nos diferentes tempos em que foi analisada, F1 apresentou algumas mudanças significativas em sua composição em ácidos graxos, porém de pouca importância. De forma geral, ao final do período de armazenamento, após 120 dias, o teor de ácidos graxos saturados apresentou aumento de 40,4% para 42,2% em detrimento do teor de ácidos graxos insaturados, que diminuiu de 59,6% para 57,8%. Esta modificação, apesar de pequena, pode estar relacionada ao processo oxidativo mais acentuado para F1 em comparação às outras formulações, conforme apresentado na Tabela 4, haja vista que as reações em cadeia da rancidez oxidativa ocorrem preferencialmente em ácidos graxos insaturados (DRANSFIELD, 2008).

As formulações F2 a F7 apresentaram redução de 60% no conteúdo de gordura animal em comparação com a formulação controle F1, sendo que parte desta redução se deveu à redução da quantidade de gordura adicionada à formulação e parte pela substituição parcial da gordura suína por

azeite de oliva. O Codex Alimentarius (CODEX, 1999) estipula que o azeite de oliva deve conter teores de 55 a 83% de ácido oleico, seu ácido graxo mais abundante, seguido do ácido linoleico (3,5 a 21%) e do palmítico (7,5 a 20%). A gordura suína e o azeite de oliva possuem, portanto, os mesmos ácidos graxos principais, mas em proporções diferentes. A adição de azeite de oliva às formulações provocou aumento significativo no teor de ácido oleico na maioria dos casos, mas principalmente após 120 dias da produção, chegando a aumentar de 44,3% em F1 para 50,4% em F6. Também foi observada diminuição no teor de ácidos graxos saturados, em geral, o que é interessante do ponto de vista nutricional, já que os ácidos mirístico e palmítico são os principais hipercolesterolemiantes (HAYES et al. 2001). Murguesa et al (2003) também verificaram que a redução de 25% no teor de gordura animal resultava em modificação no perfil de ácidos graxos, com aumento de ácidos graxos insaturados (15,22 para 23,96%) e redução de ácidos graxos saturados (37,83 pa 32,81%).

Tabela 11. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) obtidos no Perfil de Ácidos Graxos (g/100g), para as diferentes formulações e etapas de processamento.

Tempo/ Ácido graxo	Formulações						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
T0							
C14:0 Ácido Mirístico	1,47 ^{bB} $\pm 0,02$	1,55 ^{aC} $\pm 0,00$	1,40 ^{cB} $\pm 0,02$	1,31 ^{dB} $\pm 0,01$	1,45 ^{bC} $\pm 0,01$	1,56 ^{aB} $\pm 0,00$	1,37 ^{cA} $\pm 0,00$
C16:0 Ácido Palmítico	25,86 ^{aA} $\pm 0,06$	24,54 ^{bC} $\pm 0,02$	23,66 ^{dC} $\pm 0,14$	23,45 ^{dC} $\pm 0,05$	24,82 ^{bBC} $\pm 0,02$	24,84 ^{bB} $\pm 0,01$	24,39 ^{cA} $\pm 0,01$
C16:1 Ácido Palmitoleico	2,55 ^{cB} $\pm 0,01$	2,67 ^{aA} $\pm 0,00$	1,97 ^{fD} $\pm 0,01$	2,43 ^{eC} $\pm 0,00$	2,55 ^{cB} $\pm 0,00$	2,64 ^{bB} $\pm 0,00$	2,46 ^{dA} $\pm 0,00$
C18:0 Ácido Esteárico	13,04 ^{bC} $\pm 0,01$	12,54 ^{eC} $\pm 0,01$	14,36 ^{aA} $\pm 0,04$	12,16 ^{fC} $\pm 0,01$	12,87 ^{cdB} $\pm 0,00$	12,92 ^{cC} $\pm 0,01$	12,82 ^{dD} $\pm 0,00$
C18:1n9c Ácido Oleico	47,96 ^{dA} $\pm 0,06$	46,44 ^{eD} $\pm 0,01$	48,57 ^{abA} $\pm 0,11$	48,49 ^{bcB} $\pm 0,03$	48,35 ^{cA} $\pm 0,02$	46,40 ^{eD} $\pm 0,01$	48,14 ^{dC} $\pm 0,01$
C18:2n6c Ácido Linoleico	8,27 ^{gD} $\pm 0,01$	11,47 ^{aA} $\pm 0,00$	9,29 ^{eB} $\pm 0,02$	11,39 ^{bA} $\pm 0,02$	9,21 ^{fC} $\pm 0,01$	10,95 ^{cA} $\pm 0,00$	10,06 ^{dA} $\pm 0,01$
C18:3n3 Ácido alfa-Linolênico	0,83 ^{aA} $\pm 0,00$	0,69 ^{cB} $\pm 0,00$	0,76 ^{bAB} $\pm 0,01$	0,77 ^{bA} $\pm 0,00$	0,75 ^{bA} $\pm 0,00$	0,70 ^{cC} $\pm 0,01$	0,75 ^{bA} $\pm 0,00$
T30							
C14:0 Ácido Mirístico	1,48 ^{cB} $\pm 0,00$	1,61 ^{aB} $\pm 0,01$	1,37 ^{dB} $\pm 0,01$	1,45 ^{cA} $\pm 0,01$	1,57 ^{bA} $\pm 0,01$	1,32 ^{eD} $\pm 0,01$	1,32 ^{eC} $\pm 0,01$
C16:0 Ácido Palmítico	25,64 ^{aB} $\pm 0,00$	25,45 ^{bB} $\pm 0,01$	24,49 ^{deB} $\pm 0,05$	24,39 ^{eAB} $\pm 0,08$	25,11 ^{cA} $\pm 0,01$	24,40 ^{eC} $\pm 0,02$	24,61 ^{dA} $\pm 0,01$
C16:1 Ácido Palmitoleico	2,51 ^{cC} $\pm 0,02$	2,77 ^{aA} $\pm 0,08$	2,51 ^{cB} $\pm 0,00$	2,56 ^{bcA} $\pm 0,00$	2,64 ^{bA} $\pm 0,01$	2,50 ^{cC} $\pm 0,00$	2,28 ^{dB} $\pm 0,00$
C18:0 Ácido Esteárico	13,19 ^{bB} $\pm 0,01$	12,82 ^{dB} $\pm 0,02$	13,04 ^{cC} $\pm 0,02$	12,79 ^{dB} $\pm 0,02$	12,82 ^{dB} $\pm 0,01$	12,99 ^{cB} $\pm 0,01$	13,28 ^{aC} $\pm 0,01$
C18:1n9c Ácido Oleico	46,64 ^{fC} $\pm 0,02$	47,59 ^{eB} $\pm 0,07$	48,58 ^{bA} $\pm 0,03$	48,79 ^{aA} $\pm 0,05$	48,18 ^{dA} $\pm 0,00$	48,80 ^{aB} $\pm 0,01$	48,41 ^{cA} $\pm 0,00$
C18:2n6c Ácido Linoleico	9,75 ^{aB} $\pm 0,00$	9,09 ^{dA} $\pm 0,01$	9,27 ^{cB} $\pm 0,01$	9,28 ^{bcD} $\pm 0,01$	8,98 ^{eD} $\pm 0,02$	9,23 ^{cB} $\pm 0,00$	9,32 ^{bC} $\pm 0,01$
C18:3n3 Ácido alfa-Linolênico	0,80 ^{dB} $\pm 0,01$	0,67 ^{fB} $\pm 0,00$	0,75 ^{cdAB} $\pm 0,00$	0,74 ^{dBbA} $\pm 0,00$	0,70 ^{eB} $\pm 0,00$	0,76 ^{bcB} $\pm 0,00$	0,77 ^{bA} $\pm 0,01$
T60							
C14:0 Ácido Mirístico	1,47 ^{cB} $\pm 0,00$	1,72 ^{aA} $\pm 0,01$	1,59 ^{bA} $\pm 0,01$	1,38 ^{dC} $\pm 0,02$	1,49 ^{cB} $\pm 0,01$	1,63 ^{bA} $\pm 0,00$	1,34 ^{eB} $\pm 0,00$
C16:0 Ácido Palmítico	25,19 ^{dC} $\pm 0,00$	25,75 ^{cA} $\pm 0,09$	26,21 ^{aA} $\pm 0,05$	24,54 ^{fA} $\pm 0,04$	24,73 ^{eC} $\pm 0,03$	25,95 ^{bA} $\pm 0,00$	24,58 ^{efA} $\pm 0,03$
C16:1 Ácido Palmitoleico	2,71 ^{abA} $\pm 0,00$	2,74 ^{aA} $\pm 0,02$	2,64 ^{cdA} $\pm 0,03$	2,58 ^{dA} $\pm 0,00$	2,58 ^{dB} $\pm 0,01$	2,67 ^{bcA} $\pm 0,01$	2,44 ^{eA} $\pm 0,01$
C18:0 Ácido Esteárico	12,77 ^{eD} $\pm 0,01$	13,29 ^{dA} $\pm 0,03$	13,50 ^{bC} $\pm 0,00$	12,79 ^{eB} $\pm 0,02$	13,65 ^{bA} $\pm 0,01$	13,92 ^{aA} $\pm 0,02$	13,45 ^{cB} $\pm 0,00$
C18:1n9c Ácido Oleico	47,50 ^{bB} $\pm 0,00$	47,24 ^{cC} $\pm 0,07$	47,25 ^{cB} $\pm 0,01$	48,55 ^{aC} $\pm 0,10$	47,02 ^{dB} $\pm 0,04$	46,73 ^{eC} $\pm 0,03$	48,36 ^{aB} $\pm 0,01$
C18:2n6c Ácido Linoleico	9,59 ^{bC} $\pm 0,01$	8,57 ^{eD} $\pm 0,01$	8,07 ^{gC} $\pm 0,08$	9,41 ^{cB} $\pm 0,03$	9,85 ^{aB} $\pm 0,00$	8,40 ^{fD} $\pm 0,02$	9,07 ^{dD} $\pm 0,01$
C18:3n3 Ácido alfa-Linolênico	0,77 ^{aC} $\pm 0,00$	0,69 ^{cB} $\pm 0,02$	0,74 ^{bB} $\pm 0,00$	0,75 ^{abA} $\pm 0,00$	0,68 ^{cC} $\pm 0,01$	0,70 ^{cC} $\pm 0,00$	0,76 ^{abA} $\pm 0,00$
T120							

Continuação Tabela 11

C14:0 Ácido Mirístico	1,60 ^{aA} ±0,00	1,44 ^{bD} ±0,01	1,39 ^{cB} ±0,00	1,43 ^{bA} ±0,01	1,44 ^{bC} ±0,01	1,46 ^{bC} ±0,01	1,36 ^{cA} ±0,00
C16:0 Ácido Palmítico	25,89 ^{aA} ±0,03	24,30 ^{dD} ±0,04	24,58 ^{cB} ±0,04	24,26 ^{dB} ±0,01	24,87 ^{bABC} ±0,13	23,51 ^{eD} ±0,00	24,45 ^{cdB} ±0,03
C16:1 Ácido Palmitoleico	2,26 ^{dD} ±0,00	2,45 ^{abcB} ±0,02	2,40 ^{cC} ±0,02	2,49 ^{abB} ±0,02	2,39 ^{cC} ±0,03	2,52 ^{aC} ±0,00	2,45 ^{bcA} ±0,02
C18:0 Ácido Esteárico	14,74 ^{aA} ±0,00	13,25 ^{dA} ±0,01	13,53 ^{bcB} ±0,01	13,26 ^{dA} ±0,00	12,15 ^{fC} ±0,03	12,79 ^{eD} ±0,00	13,51 ^{cA} ±0,02
C18:1n9c Ácido Oleico	44,29 ^{eD} ±0,04	48,36 ^{bA} ±0,07	47,40 ^{dB} ±0,05	48,37 ^{bC} ±0,02	47,22 ^{dB} ±0,09	50,41 ^{aA} ±0,00	48,04 ^{cD} ±0,01
C18:2n6c Ácido Linoleico	10,40 ^{bA} ±0,00	9,47 ^{dB} ±0,00	9,94 ^{cA} ±0,01	9,45 ^{dB} ±0,00	11,19 ^{aA} ±0,04	8,52 ^{eC} ±0,00	9,45 ^{dB} ±0,02
C18:3n3 Ácido alfa-Linolênico	0,83 ^{aA} ±0,01	0,73 ^{dA} ±0,00	0,77 ^{cA} ±0,01	0,74 ^{dB} ±0,01	0,75 ^{dA} ±0,00	0,79 ^{bA} ±0,00	0,75 ^{cdA} ±0,00

T0 = início do processamento, T30 = fim do período de maturação, T60 e T120 = período de armazenamento a 4°C. F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma linha, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey (p<0,05). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna (mesma formulação), em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

As formulações F2 e F3 foram produzidas utilizando as mesmas culturas tradicionais e, além disto, F3 apresentou redução de 50% na quantidade de sais de cura adicionada. De forma análoga, as formulações F4 e F5 foram produzidas com adição da cultura probiótica *E. faecium*, sem e com redução de sais de cura, respectivamente, assim como F6 e F7 utilizaram o probiótico *L.acidophilus*, sem e com redução de sais de cura, respectivamente. Comparando-se os teores de ácidos graxos saturados destas formulações duas a duas, considerando que cada par tenha sido adicionado do mesmo microrganismo (F2/F3, F4/F5 e F6/F7), pode-se notar diferenças significativas eventuais em função do tempo ou da formulação, mas que não indicam uma possível influência dos teores de sais de cura nas mudanças encontradas. Estas observações podem indicar que a redução de sais de cura não resultou em alterações importantes na composição em ácidos graxos do produto, o que poderia ressaltar o aspecto vantajoso desta redução diante de perspectivas nutricionais. É importante ressaltar, entretanto, que outros resultados são necessários para confirmar esta hipótese.

As formulações adicionadas de culturas probióticas apresentaram, de forma geral, teores reduzidos de ácidos graxos saturados se comparadas à formulação controle. Após 120 dias da produção, F6, adicionada de *L.acidophilus*, continha 37,8% de ácidos graxos saturados contra 42,2% presentes em F1 no mesmo período (T120).

5.5 Análises microbiológicas

Viabilidade das culturas probióticas

Segundo as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os microrganismos probióticos devem estar presentes na faixa de 8,0 a 9,0 log UFC na recomendação (porção) diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008).

Para as formulações F4 e F5 a população de *Enterococcus faecium* CRL 183 (*Enterococcus* spp.) exibiu aumento de dois e um ciclos logarítmico, respectivamente, no final do período de maturação (T30: 8,39±0,50 e 7,98±0,08 log UFC/g). Na fase de armazenamento, independente da

formulação, verificou-se redução na população desse microrganismo (T120= F4:7,17±0,03 log UFC/g e F5: 7,18±0,27 log UFC/g) (Figura 8). A cepa *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 (*Lactobacillus* spp.) exibiu um aumento de dois ciclos logarítmicos na população de células viáveis, no final do período de maturação, para a formulação F6 e de um ciclo para F7 (T30: 8,52±0,36 e 8,45±0,19 log UFC/g). Após 90 dias de estocagem (T120) as duas formulações exibiram redução na população de *Lactobacillus* spp. Cabe destacar que, estatisticamente, não houve diferença no número de células viáveis das cepas probióticas para as formulações F5, F6 e F7, a partir do final da fermentação (T7).

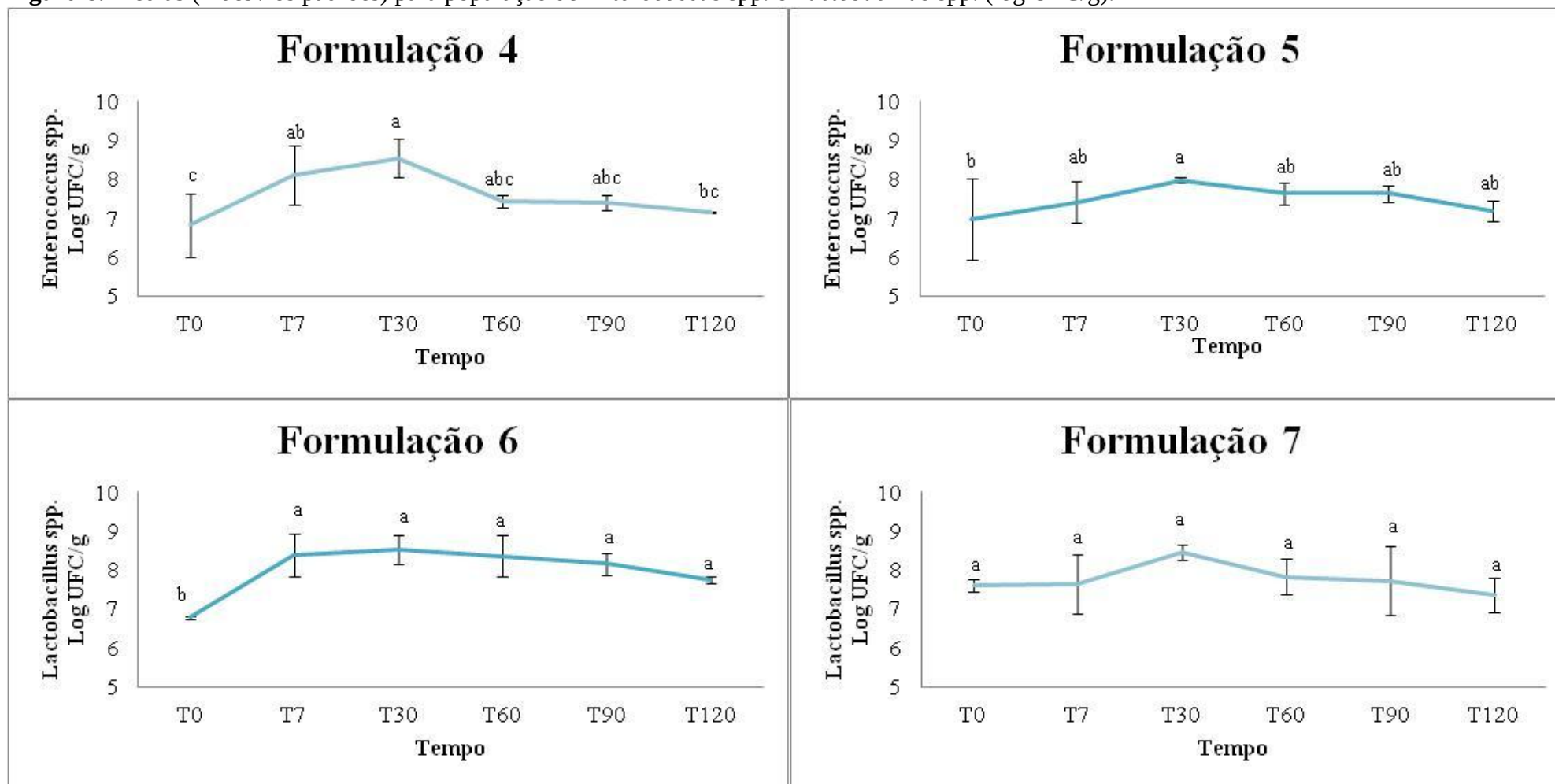
Os resultados obtidos confirmam os dos testes preliminares de resistência aos sais de cura e indicam que as cepas utilizadas na fermentação são capazes de sobreviver e se multiplicar na matriz cárnea em questão. Apesar da redução numérica na população de microrganismos probióticos observada, uma ingestão diária superior a 10 g dos embutidos probióticos (F4, F5, F6 e F7) seria suficiente para respeitar as recomendações da ANVISA e para que os possíveis efeitos benéficos à saúde sejam observados.

Colônias com morfologias distintas, confirmadas como pertencentes aos gêneros *Enterococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. foram submetidas a testes bioquímicos para identificação de espécies, utilizando-se o sistema API 20-Strep e API 60 CH, respectivamente (Anexos 6 e 7). Os resultados mostraram que em média 90% das colônias eram pertencentes às espécies *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus acidophilus*, sugerindo que os microrganismos probióticos utilizados no processo de fermentação foram capazes de se multiplicar e dominar a microbiota do produto.

Macedo et al. (2008) utilizou três cepas de *Lactobacillus* spp., em associação com culturas iniciadoras comerciais, para a produção de salame probiótico. No final do período de maturação (T25), a população de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. casei* foi de $9,50 \cdot 10^7$, $5,50 \cdot 10^7$ e $3,45 \cdot 10^7$, respectivamente. Comam et al. (2012) verificaram que as cepas probióticas *L. rhamnosus* IMC 501 e *L. paracasei* IMC 502 se desenvolveram em salames italianos e suíços, respectivamente, exibindo população de células viáveis de 10^8 UFC/g no final do período de armazenamento. Resultados

semelhantes foram encontrados por Rubio et al. (2013a), que constataram que a cepa *L. rhamnosus* GG foi capaz de dominar a microbiota natural da carne em um salame fermentado espanhol, alcançando níveis de 10^8 UFC/g no final dos períodos de maturação e armazenamento. Em outro estudo, Rubio et al. (2014) avaliaram seis cepas de *Lactobacillus* spp. (*L. casei* CTC1677, *L. casei* CTC1678, *L. rhamnosus* CTC1679, *L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota) como culturas iniciadoras em salames fermentados com redução de sódio e gordura e somente *L. rhamnosus* CTC1679 foi capaz de se multiplicar e alcançar níveis de 10^8 UFC/g no final do período de maturação.

Figura 8. Médias ($\pm$ desvios padrões) para população de *Enterococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. (log UFC/g).



Formulação 4: cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183), com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; Formulação 5: cultura probiótica (*E. faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; Formulação 6: cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; Formulação 7: cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e de nitrito e nitrato. T0 = início do processamento, T7 = fim do período de fermentação, T30 = fim do período de maturação, T60, T90 = período de armazenamento a 4°C. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Segurança microbiológica dos produtos

Na Tabela 12 são apresentados os resultados referentes à população de microrganismos contaminantes presentes nos embutidos, nas diferentes etapas do estudo. Verificou-se uma redução da população de todos os grupos de microrganismos estudados ao longo do período experimental, sendo que *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* estiveram ausentes nas amostras desde o início do processo (T0). A fermentação foi essencial para redução da população de microrganismos, pois, no final dessa etapa (T7), todas as formulações exibiram diminuição nas populações de coliformes a 45°C/ *E.coli*. Após o término da fase de maturação (T30), não foi detectada a presença de coliformes a 45°C/ *E.coli*. (Petrifilm™ *E.coli*/Coliform count plate da 3M - resultados expressos como menor que uma UFC/g).

A população de estafilococos coagulase positiva também foi reduzida durante o período de armazenamento, sendo que somente as formulações F3, F4 e F7 não apresentaram diferença significativa na análise entre tempos. Cabe salientar que, entre as formulações potencialmente probióticas, a F5 exibiu a maior redução desse grupo de microrganismos no final dos 120 dias de armazenamento (1,58 log UFC/g).

Os resultados obtidos estão de acordo com a RDC N°. 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 02 de janeiro de 2001, que estabelece limite máximo de 5×10^3 UFC/g (3,7 log UFC/g) para estafilococos coagulase positiva, 10^3 UFC/g (3,0 log UFC/g) para coliformes a 45°C e ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de amostra, em produtos cárneos maturados, como o salame.

Tabela 12. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) para população de microrganismos potencialmente patogênicos – segurança microbiológica.

		Estafilococos coagulase positiva (log UFC/g)	Coliformes a 45°C/ <i>E.coli</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> <i>Monocytogenes</i>	<i>C.botulinum</i>
T0	F1	4,97 ^{aA} $\pm$ 0,59	3,52 ^{aA} $\pm$ 0,16	Ausente	Ausente	Ausente
	F2	4,35 ^{aA} $\pm$ 0,10	3,32 ^{aA} $\pm$ 0,16	Ausente	Ausente	Ausente
	F3	4,30 ^{aA} $\pm$ 0,71	3,50 ^{aA} $\pm$ 0,11	Ausente	Ausente	Ausente
	F4	4,25 ^{aA} $\pm$ 0,77	3,36 ^{aA} $\pm$ 0,11	Ausente	Ausente	Ausente
	F5	4,19 ^{aA} $\pm$ 0,11	3,53 ^{aA} $\pm$ 0,24	Ausente	Ausente	Ausente
	F6	4,38 ^{aA} $\pm$ 0,09	3,59 ^{aA} $\pm$ 0,10	Ausente	Ausente	Ausente
	F7	3,77 ^{bA} $\pm$ 0,61	3,53 ^{aA} $\pm$ 0,05	Ausente	Ausente	Ausente
T7	F1	3,81 ^{aB} $\pm$ 0,44	2,18 ^{aB} $\pm$ 0,00	Ausente	Ausente	Ausente
	F2	3,74 ^{aB} $\pm$ 0,07	1,86 ^{aB} $\pm$ 0,53	Ausente	Ausente	Ausente
	F3	3,73 ^{aA} $\pm$ 0,02	2,24 ^{aB} $\pm$ 0,09	Ausente	Ausente	Ausente
	F4	4,25 ^{aA} $\pm$ 0,77	2,27 ^{aB} $\pm$ 0,05	Ausente	Ausente	Ausente
	F5	3,42 ^{aAB} $\pm$ 0,54	2,35 ^{aB} $\pm$ 0,07	Ausente	Ausente	Ausente
	F6	3,76 ^{aB} $\pm$ 0,05	2,27 ^{aB} $\pm$ 0,01	Ausente	Ausente	Ausente
	F7	3,34 ^{aA} $\pm$ 0,40	2,07 ^{aB} $\pm$ 0,16	Ausente	Ausente	Ausente
T30	F1	3,59 ^{aB} $\pm$ 0,12	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F2	3,68 ^{aB} $\pm$ 0,19	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F3	3,70 ^{aA} $\pm$ 0,01	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F4	3,69 ^{aA} $\pm$ 0,06	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F5	3,45 ^{aAB} $\pm$ 0,49	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F6	3,70 ^{aB} $\pm$ 0,02	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F7	3,64 ^{aA} $\pm$ 0,21	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
T60	F1	3,56 ^{aB} $\pm$ 0,11	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F2	3,69 ^{aBC} $\pm$ 0,32	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F3	3,69 ^{aA} $\pm$ 0,07	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F4	3,68 ^{aA} $\pm$ 0,03	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F5	3,01 ^{aAB} $\pm$ 0,70	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F6	3,60 ^{aB} $\pm$ 0,30	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F7	3,59 ^{aA} $\pm$ 0,48	< 1	Ausente	Ausente	Ausente

Continuação Tabela 12

T90	F1	3,35 ^{aB} ±0,08	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F2	3,57 ^{aBC} ±0,33	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F3	3,66 ^{aA} ±0,08	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F4	3,59 ^{aA} ±0,20	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F5	3,29 ^{aAB} ±0,03	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F6	3,69 ^{aB} ±0,12	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F7	3,62 ^{aA} ±0,02	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
T120	F1	3,23 ^{aB} ±0,07	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F2	3,17 ^{aC} ±0,03	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F3	3,46 ^{aA} ±0,51	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F4	3,06 ^{aA} ±0,26	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F5	2,61 ^{bB} ±0,01	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F6	3,66 ^{aB} ±0,12	< 1	Ausente	Ausente	Ausente
	F7	3,63 ^{aA} ±0,31	< 1	Ausente	Ausente	Ausente

T0 = início do processamento, T7 = fim do período de fermentação, T30 = fim do período de maturação, T60, T90, T120 = período de armazenamento a 4°C; F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, no mesmo intervalo de tempo, não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey (p<0,05). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas iguais, para a mesma formulação em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

5.6 Análise sensorial

Teste de aceitação

Na Tabela 13 são apresentados os valores de aparência, cor, aroma, textura, sabor e impressão global obtidos no teste de aceitação das 7 formulações nos tempos 30 (produto pronto para consumo), 60, 90 e 120 (tempos de armazenamento).

As diferentes formulações apresentaram boa aceitação para todos os atributos avaliados e a redução de gordura e de sais de cura, bem como a substituição de culturas iniciadoras tradicionais por outras probióticas, não influenciou a impressão hedônica dos consumidores até o final do período de maturação (T30) ($p < 0,05$).

Durante o período de armazenamento (T60 a T120), as notas continuaram elevadas para os atributos avaliados, com médias próximas a 7,0 para as diferentes formulações. No final dos 120 dias de armazenamento, as amostras potencialmente probióticas exibiram médias de aceitação inferiores para aparência (*Enterococcus faecium* CRL183) e textura (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014), sem interferir na impressão global das amostras ($p < 0,05$).

Os resultados da intenção de compra (Figura 9) confirmaram os resultados do teste de aceitação, sendo que, em todos os tempos analisados, uma parcela superior a 60% dos consumidores certamente ou provavelmente comprariam os produtos, com exceção das formulações F3 e F6 no T60 (48% e 47%, respectivamente provavelmente ou certamente comprariam o produto).

Outros autores avaliaram o efeito da inclusão de óleos vegetais em substituição à gordura animal em produtos embutidos e os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Backes et al (2013) avaliaram o efeito da substituição parcial da gordura suína por emulsão contendo óleo de canola em salame tipo Italiano. Nesse estudo foram avaliadas três formulações: Controle (100% de gordura suína, sem substituição de gordura; T1 (15% da gordura suína foi substituída pela emulsão contendo óleo de canola) e T2 (30% da gordura suína foi substituída pela emulsão com óleo de canola). A aceitação das amostras foi avaliada utilizando uma escala hedônica

estruturada de sete pontos, variando de desgostei muitíssimo (1) a gostei muitíssimo (7). As médias de aceitação obtidas para todas as formulações e atributos ficaram próximas de cinco (5), indicando que a substituição de gordura animal por óleo vegetal não afetou a aceitação do produto.

Bloukas; Paneras; Fournitzis (1997) estudaram o efeito da substituição de gordura animal por óleo de oliva em salames fermentados. Foram produzidas cinco formulações: A) Controle (24% de carne bovina, 43% de carne de porco e 22% de gordura de porco; B) e C) substituição de 10% e 20% da gordura animal por óleo de oliva, respectivamente. D) e E) substituição de 10% e 20% da gordura animal por óleo de oliva pré-emulsificado com proteína isolada de soja, respectivamente. As características sensoriais das diferentes formulações foram avaliadas utilizando uma escala de sete pontos (7=excelente; 6=muito bom; 5=bom; 4=aceitável; 3= justo; 2=ligeiramente inaceitável; 1=inaceitável). Os salames produzidos com óleo de oliva pré-emulsificado apresentaram características sensoriais semelhantes às do controle, com médias sensoriais superiores a cinco para aroma e sabor, sendo que o teor de óleo adicionado não influenciou os resultados. Por outro lado, a substituição de gordura animal por óleo de oliva alterou negativamente as características sensoriais dos produtos fermentados.

Tabela 13. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) das notas obtidas nos testes aceitação de cada atributo avaliado nas diferentes formulações.

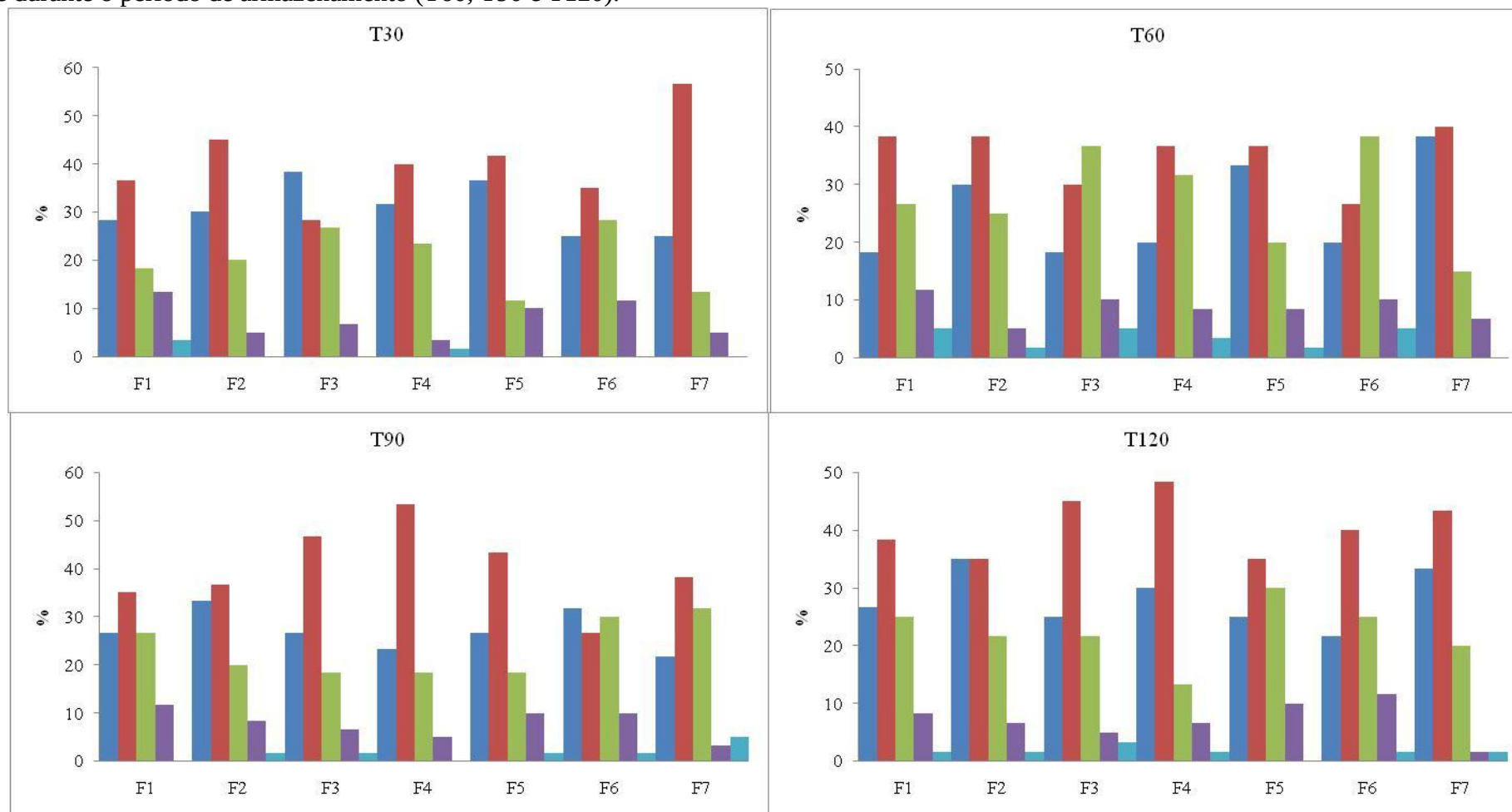
<i>Tempo/Atributo</i>	<i>Formulações</i>						
	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>F5</i>	<i>F6</i>	<i>F7</i>
<i>T30</i>							
Aparência	7,55 ^{abA} $\pm$ 1,24	7,60 ^{abA} $\pm$ 1,08	8,07 ^{aA} $\pm$ 0,72	7,53 ^{abA} $\pm$ 1,07	7,43 ^{bAB} $\pm$ 1,16	8,00 ^{aA} $\pm$ 0,82	7,66 ^{abAB} $\pm$ 1,04
Cor	7,82 ^{aA} $\pm$ 1,07	7,58 ^{aA} $\pm$ 1,08	8,03 ^{aA} $\pm$ 0,83	7,65 ^{aA} $\pm$ 1,01	7,50 ^{aAB} $\pm$ 1,19	7,75 ^{aA} $\pm$ 1,02	7,63 ^{aA} $\pm$ 1,02
Aroma	6,85 ^{aA} $\pm$ 1,26	7,35 ^{aA} $\pm$ 1,18	7,14 ^{aA} $\pm$ 1,43	6,98 ^{aA} $\pm$ 1,05	7,15 ^{aA} $\pm$ 1,27	7,17 ^{aA} $\pm$ 1,43	7,32 ^{aA} $\pm$ 1,15
Textura	7,53 ^{aA} $\pm$ 1,17	7,52 ^{aA} $\pm$ 1,00	7,51 ^{aA} $\pm$ 1,17	7,50 ^{aA} $\pm$ 1,17	7,62 ^{aA} $\pm$ 0,96	7,28 ^{aA} $\pm$ 1,25	7,42 ^{aA} $\pm$ 1,07
Sabor	7,03 ^{aA} $\pm$ 1,55	7,35 ^{aA} $\pm$ 1,02	7,41 ^{aA} $\pm$ 1,43	7,55 ^{aAB} $\pm$ 1,14	7,58 ^{aA} $\pm$ 1,11	7,27 ^{aA} $\pm$ 1,69	7,53 ^{aA} $\pm$ 1,06
I. Global	7,27 ^{aA} $\pm$ 1,25	7,52 ^{aA} $\pm$ 0,93	7,59 ^{aA} $\pm$ 1,15	7,33 ^{aAB} $\pm$ 1,17	7,55 ^{aA} $\pm$ 0,98	7,38 ^{aA} $\pm$ 1,22	7,56 ^{aA} $\pm$ 0,99
<i>T60</i>							
Aparência	7,32 ^{abA} $\pm$ 1,19	7,37 ^{abA} $\pm$ 1,07	7,90 ^{aA} $\pm$ 0,99	7,20 ^{bA} $\pm$ 1,40	7,62 ^{abA} $\pm$ 1,12	7,72 ^{abA} $\pm$ 1,45	7,63 ^{abAB} $\pm$ 1,06
Cor	7,45 ^{aAB} $\pm$ 1,13	7,42 ^{aA} $\pm$ 1,27	7,77 ^{aA} $\pm$ 1,27	7,23 ^{aA} $\pm$ 1,17	7,53 ^{aA} $\pm$ 1,07	7,65 ^{bA} $\pm$ 1,16	7,70 ^{aA} $\pm$ 1,03
Aroma	6,53 ^{ca} $\pm$ 1,26	7,15 ^{aA} $\pm$ 1,26	7,20 ^{abA} $\pm$ 1,19	6,70 ^{bcA} $\pm$ 1,58	7,33 ^{abA} $\pm$ 1,24	7,27 ^{abA} $\pm$ 1,39	7,53 ^{aA} $\pm$ 1,05
Textura	7,07 ^{abcA} $\pm$ 1,15	7,47 ^{aA} $\pm$ 1,02	6,50 ^{bcB} $\pm$ 1,69	7,13 ^{abA} $\pm$ 1,26	7,42 ^{aA} $\pm$ 1,12	6,35 ^{cb} $\pm$ 1,76	7,37 ^{aA} $\pm$ 1,21
Sabor	6,72 ^{bA} $\pm$ 1,17	7,20 ^{abA} $\pm$ 1,33	6,82 ^{abA} $\pm$ 1,53	7,00 ^{abAB} $\pm$ 1,56	7,28 ^{abA} $\pm$ 1,24	7,05 ^{abA} $\pm$ 1,37	7,63 ^{aA} $\pm$ 1,07
I. Global	6,93 ^{abA} $\pm$ 1,29	7,22 ^{abA} $\pm$ 1,03	6,70 ^{bb} $\pm$ 1,68	6,95 ^{abB} $\pm$ 1,47	7,37 ^{abA} $\pm$ 1,06	6,85 ^{abA} $\pm$ 1,54	7,53 ^{aAB} $\pm$ 1,02
<i>T90</i>							
Aparência	7,40 ^{abcA} $\pm$ 1,21	7,73 ^{abA} $\pm$ 1,23	7,92 ^{aA} $\pm$ 0,91	7,47 ^{abcA} $\pm$ 1,07	7,05 ^{cb} $\pm$ 1,55	7,82 ^{aA} $\pm$ 0,95	7,18 ^{bcB} $\pm$ 1,51
Cor	7,30 ^{abA} $\pm$ 1,14	7,62 ^{aA} $\pm$ 1,29	7,80 ^{aA} $\pm$ 0,99	7,37 ^{abA} $\pm$ 1,26	6,92 ^{bb} $\pm$ 1,65	7,63 ^{aA} $\pm$ 1,07	6,88 ^{bb} $\pm$ 1,79
Aroma	6,63 ^{ca} $\pm$ 1,39	7,65 ^{aA} $\pm$ 1,23	7,50 ^{abA} $\pm$ 1,13	6,98 ^{bcA} $\pm$ 1,30	7,43 ^{abA} $\pm$ 1,48	7,42 ^{abA} $\pm$ 1,15	7,33 ^{abA} $\pm$ 1,56
Textura	7,32 ^{abA} $\pm$ 1,35	7,57 ^{aA} $\pm$ 1,41	6,92 ^{abAB} $\pm$ 1,44	7,00 ^{abA} $\pm$ 1,15	7,52 ^{abA} $\pm$ 1,38	6,85 ^{bAB} $\pm$ 1,46	7,30 ^{abA} $\pm$ 1,51
Sabor	6,68 ^{bA} $\pm$ 1,46	7,38 ^{acA} $\pm$ 1,30	7,30 ^{abA} $\pm$ 1,34	7,32 ^{abAB} $\pm$ 1,11	7,55 ^{aA} $\pm$ 1,57	7,37 ^{aA} $\pm$ 1,21	7,08 ^{abA} $\pm$ 1,61
I. Global	6,93 ^{aA} $\pm$ 1,29	7,42 ^{aA} $\pm$ 1,20	7,45 ^{aA} $\pm$ 1,20	7,18 ^{aAB} $\pm$ 1,11	7,30 ^{aA} $\pm$ 1,46	7,33 ^{aA} $\pm$ 1,19	7,00 ^{aB} $\pm$ 1,45
<i>T120</i>							
Aparência	7,62 ^{abA} $\pm$ 1,01	7,45 ^{abA} $\pm$ 1,17	7,83 ^{aA} $\pm$ 0,99	7,42 ^{abA} $\pm$ 1,45	7,10 ^{bAB} $\pm$ 1,12	7,76 ^{aA} $\pm$ 1,04	7,75 ^{aA} $\pm$ 1,08
Cor	7,72 ^{aAB} $\pm$ 0,98	7,35 ^{abA} $\pm$ 1,36	7,92 ^{aA} $\pm$ 1,06	7,47 ^{abA} $\pm$ 1,33	7,05 ^{abAB} $\pm$ 1,21	7,75 ^{aA} $\pm$ 1,14	7,56 ^{abA} $\pm$ 1,13
Aroma	7,08 ^{aA} $\pm$ 1,23	7,55 ^{aA} $\pm$ 1,20	7,37 ^{aA} $\pm$ 1,29	7,08 ^{aA} $\pm$ 1,41	7,41 ^{aA} $\pm$ 1,21	7,41 ^{aA} $\pm$ 1,30	7,54 ^{aA} $\pm$ 1,12
Textura	7,30 ^{abA} $\pm$ 1,15	7,63 ^{aA} $\pm$ 1,10	6,97 ^{bAB} $\pm$ 1,50	7,50 ^{abA} $\pm$ 1,12	7,36 ^{abA} $\pm$ 1,23	6,95 ^{bAB} $\pm$ 1,27	7,44 ^{abA} $\pm$ 1,04
Sabor	7,08 ^{aA} $\pm$ 1,23	7,55 ^{aA} $\pm$ 1,17	7,22 ^{aA} $\pm$ 1,51	7,63 ^{aA} $\pm$ 1,12	7,37 ^{aA} $\pm$ 1,07	7,39 ^{aA} $\pm$ 1,23	7,49 ^{aA} $\pm$ 1,34

Continuação Tabela 13

I. Global	7,15 ^{aA} ±1,13	7,40 ^{aA} ±1,18	7,27 ^{aAB} ±1,45	7,55 ^{aA} ±1,24	7,27 ^{aA} ±1,13	7,34 ^{aA} ±1,21	7,59 ^{aA} ±1,02
-----------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

T30 = fim do período de maturação, T60, T90 e 120 = período de armazenamento a 4°C; F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Escala hedônica estruturada mista de nove pontos: 9 gostei muitíssimo, 8 gostei muito, 7 gostei moderadamente, 6 gostei ligeiramente, 5 nem gostei /nem desgostei, 4 desgostei ligeiramente, 3 desgostei moderadamente, 2 desgostei muito, 1 desgostei extremamente. Análise entre formulações: médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey (p<0,05). Análise entre tempos: médias com letras maiúsculas iguais, para a mesma formulação em tempos diferentes, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Figura 9. Distribuição da frequência das notas correspondentes à escala utilizada para avaliar a intenção de compra nos produtos prontos para o consumo (T30) e durante o período de armazenamento (T60, T90 e T120).



F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. ■ Certamente compraria ■ Provavelmente compraria ■ Tenho dúvidas se compraria ■ Provavelmente não compraria ■ Certamente não compraria

Análise Descritiva Quantitativa

Inicialmente foram recrutados, por meio de questionário, 30 voluntários, consumidores de salame, entre estudantes e funcionários da FCFAr/UNESP. A pré-seleção dos assessores foi realizada através de testes triangulares, aplicados à análise sequencial de Wald. Os valores utilizados foram: $\rho_0=0,45$ (máxima inabilidade aceitável), $\rho_1=0,70$ (mínima habilidade aceitável) e para os riscos $\alpha=0,05$ (probabilidade de aceitar um candidato sem acuidade sensorial) e $\beta=0,05$ (probabilidade de rejeitar um candidato com acuidade sensorial). Foram utilizadas duas amostras de salames tipo italiano comerciais (Aurora e Sadia) e nessa etapa os voluntários foram instruídos a avaliar somente o aroma e o sabor dos produtos. As análises foram conduzidas sob luz amarela para mascarar possíveis diferenças de cor.

Os 22 voluntários pré-selecionados na etapa anterior realizaram o levantamento dos termos descritores dos salames (método de rede – Anexo 8) e, por consenso, decidiram que 16 atributos seriam suficientes para caracterizar os produtos. Após a seleção, os atributos foram definidos, as fichas de avaliação montadas (Anexo 9) e as referências para os extremos da escala escolhidas, em consenso com a equipe (Tabela 14).

A equipe pré-selecionada, após o treinamento, realizado em quatro dias, com duas a três sessões diárias, foi submetida à seleção. Nessa etapa as amostras (sete formulações) foram avaliadas de forma monádica, com três repetições utilizando a ficha elaborada anteriormente. Foram selecionados os voluntários que apresentaram capacidade de discriminação (p de F amostra $< 0,30$), repetibilidade (p de F repetição $> 0,05$) (Tabelas 15 e 16) e concordância com a equipe. A interação amostras x provador foi significativa para todos os atributos ($p < 0,05$), entretanto, gráficos construídos com as médias dos voluntários para cada atributo evidenciaram que a interação não era grave, uma vez que as retas seguiam a mesma tendência. Em outras palavras, alguns assessores estavam utilizando regiões diferentes da escala para avaliar as mesmas amostras. Para resolver esse problema, os assessores que estavam utilizando regiões diferentes da escala participaram de sessões extras de treinamento. A Figura 10 exemplifica a interação amostra x provador para os atributos cor, quantidade de gordura, sabor ácido e de ranço.

Os assessores selecionados realizaram as análises finais, novamente em triplicata. Os resultados obtidos são representados, graficamente, pelo gráfico aranha e pelo gráfico ACP.

Os resultados apresentados na Figura 11 sugerem que a formulação controle (F1), sem redução de gordura e sais de cura, apresentou um comportamento distinto, com médias superiores para brilho, regularidade de borda, quantidade de gordura, suculento, maciez e sabor de ranço. As demais formulações apresentaram um comportamento muito semelhante, uma vez que as diferenças entre as médias foram numericamente baixas.

Tabela 14. Definições e referências para os atributos sensoriais das amostras de salame tipo italiano.

ATRIBUTOS	DEFINIÇÕES	REFERÊNCIAS
APARÊNCIA		
Cor vermelha (COR)	Cor característica de embutidos crus	Fraca: Ketchup Hellmann's Forte: Vermelho de metila
Quantidade de gordura (QG)	Presença de glóbulos de gordura no salame	Pouca: Salame Seara (fatia: 0,3mm de espessura) Muita: Salame Aurora (fatia: 0,3mm de espessura)
Uniformidade de gordura (UG)	Tamanho regular das partículas de gordura na superfície do salame (fatia)	Pouca: Salame Seara (fatia: 0,3mm de espessura) Muita: Salame Aurora (fatia: 0,3mm de espessura)
Regularidade da borda (RB)	Aspecto rugoso da borda do salame (fatia)	Pouco: Salame Seara (fatia: 0,3mm de espessura) Muito: Salame Aurora (fatia: 0,3mm de espessura)
Brilho (B)	Característica relacionada à presença de gordura na superfície do salame (fatia)	Pouco: Salame Seara (fatia: 0,3mm de espessura) Muito: Salame Aurora (fatia: 0,3mm de espessura)
AROMA		
Condimentado (CO)	Aroma característico da presença de especiarias (alho, pimenta, sal)	Fraco: Caldo alho e pimenta Siamar diluído (10%) Forte: Caldo alho e pimenta Siamar
De carne (CA)	Aroma cárneo característico de embutido tipo salame.	Fraco: Extrato de carne líquido Maggi diluído (10%) Forte: Extrato de carne líquido Maggi
Oxidado (OX)	Aroma característico de óleo vegetal usado	Fraco: Óleo de soja Liza Forte: Óleo de soja Liza aquecido em estufa
TEXTURA		
Maciez (MA)	Facilidade de mastigação	Pouco: Hambúrguer Seara (assado à 180°C e cortado em porções de 2x2cm) Muito: Salsicha Sadia (cozida em água fervente por 10 min)
Suculento (SU)	Característica relacionada à presença de umidade no produto	Pouco: Hambúrguer Seara (assado à 180°C e cortado em porções de 2x2cm) Muito: Salsicha Sadia (cozida em água fervente por 10 min)
SABOR		
Salgado (SA)	Sabor estimulado pelo cloreto de sódio (sal de cozinha)	Pouco: solução de NaCl 1% Muito: solução de NaCl 10%
Condimentado (CD)	Sabor relacionado à presença de especiarias (alho, pimenta, sal)	Fraco: Caldo alho e pimenta Siamar diluído (10%) Forte: Caldo alho e pimenta Siamar
Ácido (AC)	Acidez característica de embutidos fermentados	Pouco: Solução (0,01%) de ácido cítrico diluída Muito: Solução (5%) de ácido cítrico
Ranço (RA)	Sabor característico de gordura envelhecida	Fraco: Óleo de soja Liza Forte: Óleo de soja Liza aquecido em estufa
Defumado (DF)	Sabor característico de produtos cárneos submetidos ao processo de defumação	Fraco: Mortadela comum Seara (fatia: 0,2mm de espessura) Forte: Mortadela defumada Seara (fatia: 0,2mm de espessura)
Picante (PI)	Sabor relacionado à presença de pimenta	Fraco: Molho de pimenta Siamar diluído (10%) Forte: Molho de pimenta Siamar

Tabela 15. Níveis de significância (p) para cada assessor em função de discriminação das amostras (p de $F_{amostra}$).

Atributo/Provador		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Aparência	Cor	0,0005	0,0039	0,0007	0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0003	0,0001	<0,0001	0,0039
	Quantidade de gordura	0,0052	0,0001	0,0075	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Uniformidade de gordura	0,0003	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,0007	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0006	<0,0001	<0,0001
	Regularidade da borda	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Brilho	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Aroma	Condimentado	0,1265	0,2357	0,0050	0,3380	0,0176	0,1157	0,0050	0,0210	0,0079	0,0040	0,2357	0,0026	0,2558
	De carne	0,0014	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Oxidado	0,2395	0,2472	0,0023	<0,0001	0,0377	0,0007	0,0752	0,0213	0,1338	0,0034	0,0110	0,0745	0,0752
Textura	Maciez	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Suculento	0,0031	<0,0001	<0,0001	0,0009	<0,0001	<0,0001	0,0001	0,0011	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
Sabor	Salgado	0,0091	0,0258	0,0040	0,0003	0,0401	0,5415	0,0283	0,1168	0,0258	0,0008	0,0208	0,4460	0,1181
	Condimentado	0,1265	0,2357	0,0050	0,3380	0,0176	0,1157	0,0050	0,0210	0,0079	0,0040	0,2357	0,0026	0,2558
	Ácido	0,1760	0,0005	0,0669	0,0002	0,0013	0,4097	0,0770	0,0113	0,0677	0,0229	0,0070	0,0005	0,1571
	Ranço	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Defumado	0,0590	0,0011	0,0968	0,6202	<0,0001	0,0099	0,0004	0,0004	<0,0001	0,0008	0,0012	0,0003	0,0136
	Picante	0,0357	0,1143	0,0628	0,2518	<0,0001	0,0157	0,1627	0,0039	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0044

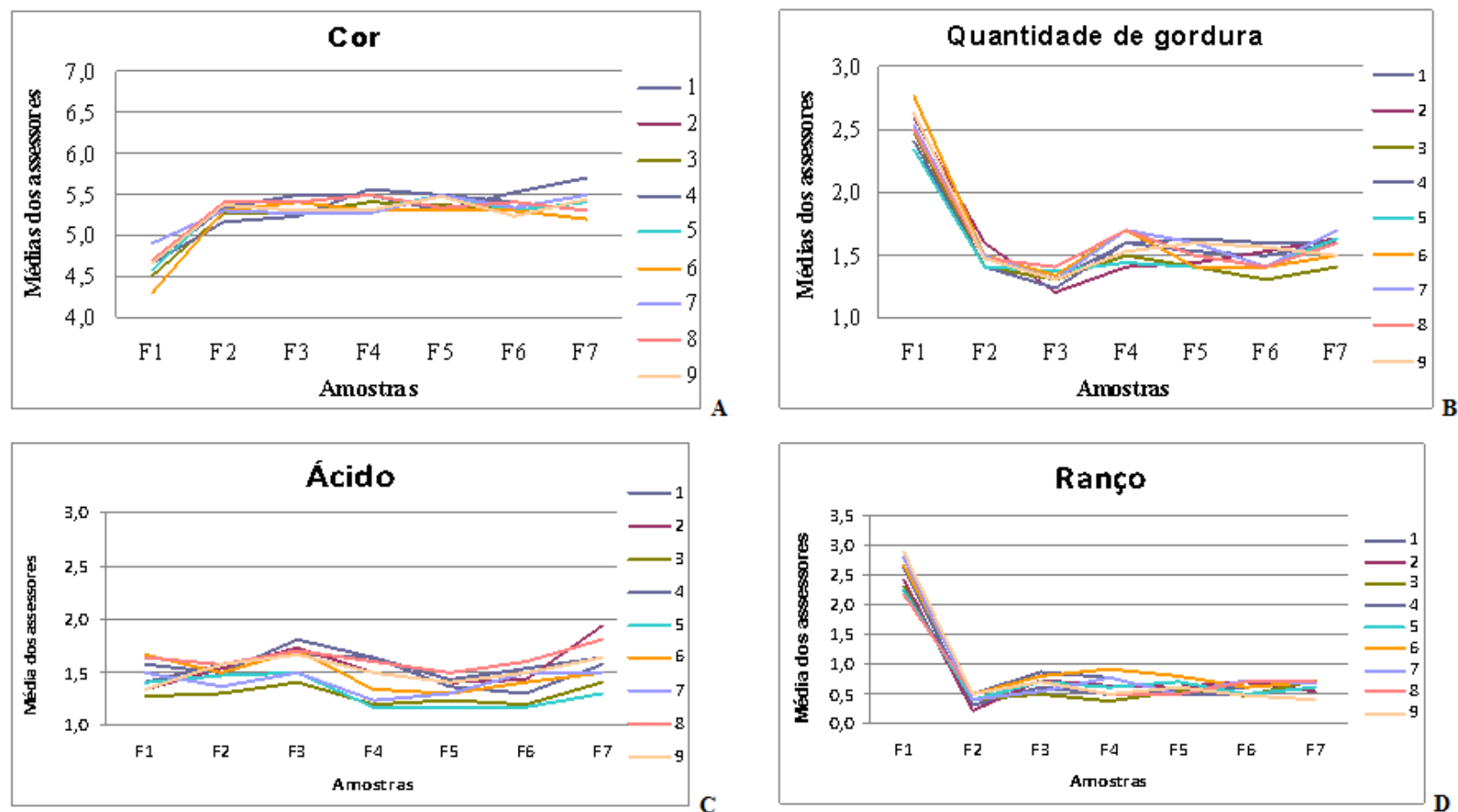
Assessores com p de F amostra < 0,30 foram selecionados.

Tabela 16. Níveis de significância (p) para cada assessor em função da repetibilidade (p de $F_{\text{repetição}}$).

Atributo/Provedor		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Aparência	Cor	0,6838	0,1840	0,9378	0,8211	0,2871	0,8474	0,6610	0,8591	0,2814	0,4281	0,5841	0,0434	0,1840
	Quantidade de gordura	0,8506	0,5411	0,8031	0,2658	0,3974	0,7403	0,6245	0,8040	0,0832	0,5290	0,0002	0,8040	0,5620
	Uniformidade de gordura	0,6286	0,2728	0,1344	0,9848	0,4353	0,2397	0,3619	0,2682	0,2682	0,8944	0,8752	0,3400	0,1153
	Regularidade da borda	0,7938	0,2194	0,7029	0,1612	0,3562	0,3185	0,0969	0,3003	0,4627	0,2384	0,5645	0,8484	0,4776
	Brilho	0,6905	0,6264	0,3081	0,9226	0,5028	0,8992	0,5348	0,5922	0,7064	0,6070	0,3019	0,9826	0,7165
Aroma	Condimentado	0,3331	0,9155	0,5347	0,1633	0,9157	0,4139	0,3791	0,7681	0,1854	0,0741	0,9155	0,0487	0,7441
	De carne	0,9873	0,3966	0,7175	0,7230	0,0828	0,0406	0,4509	0,7921	0,7342	0,5573	0,4828	0,0062	0,5573
	Oxidado	0,6732	0,6691	0,4104	0,2095	0,8693	0,2606	0,1363	0,9557	0,2814	0,7564	0,9675	0,2295	0,1363
Textura	Maciez	0,1591	0,3110	0,0373	0,5231	0,6351	0,7462	0,7331	0,7564	0,6410	0,1525	0,8557	0,0716	0,3413
	Suculento	0,2711	0,1549	0,8931	0,9246	0,4630	0,2377	0,4434	0,7927	0,7342	0,1414	0,6070	0,1532	0,9694
Sabor	Salgado	0,1225	0,0986	0,1431	0,3534	0,2487	0,6723	0,4047	0,6192	0,0986	0,6568	0,6723	0,4460	0,4297
	Condimentado	0,3331	0,9155	0,5347	0,1633	0,9157	0,4139	0,3791	0,7681	0,1854	0,0741	0,9155	0,0487	0,7441
	Ácido	0,2814	0,0674	0,7284	0,8040	0,5964	0,7097	0,8530	0,5512	0,5975	0,7462	0,4488	0,3884	0,2284
	Ranço	0,5365	0,2533	0,1317	0,7879	0,7384	0,3153	0,4946	0,8088	0,2278	0,1694	0,8404	0,6100	0,6410
	Defumado	0,2161	0,3472	0,8857	0,8599	0,2048	0,5336	0,6521	1,0000	0,4242	0,3134	0,3254	0,0011	0,8002
	Picante	0,5945	0,4933	0,6633	0,3407	0,4970	0,8159	0,6732	0,9743	0,0960	0,3619	0,2203	0,8654	0,6734

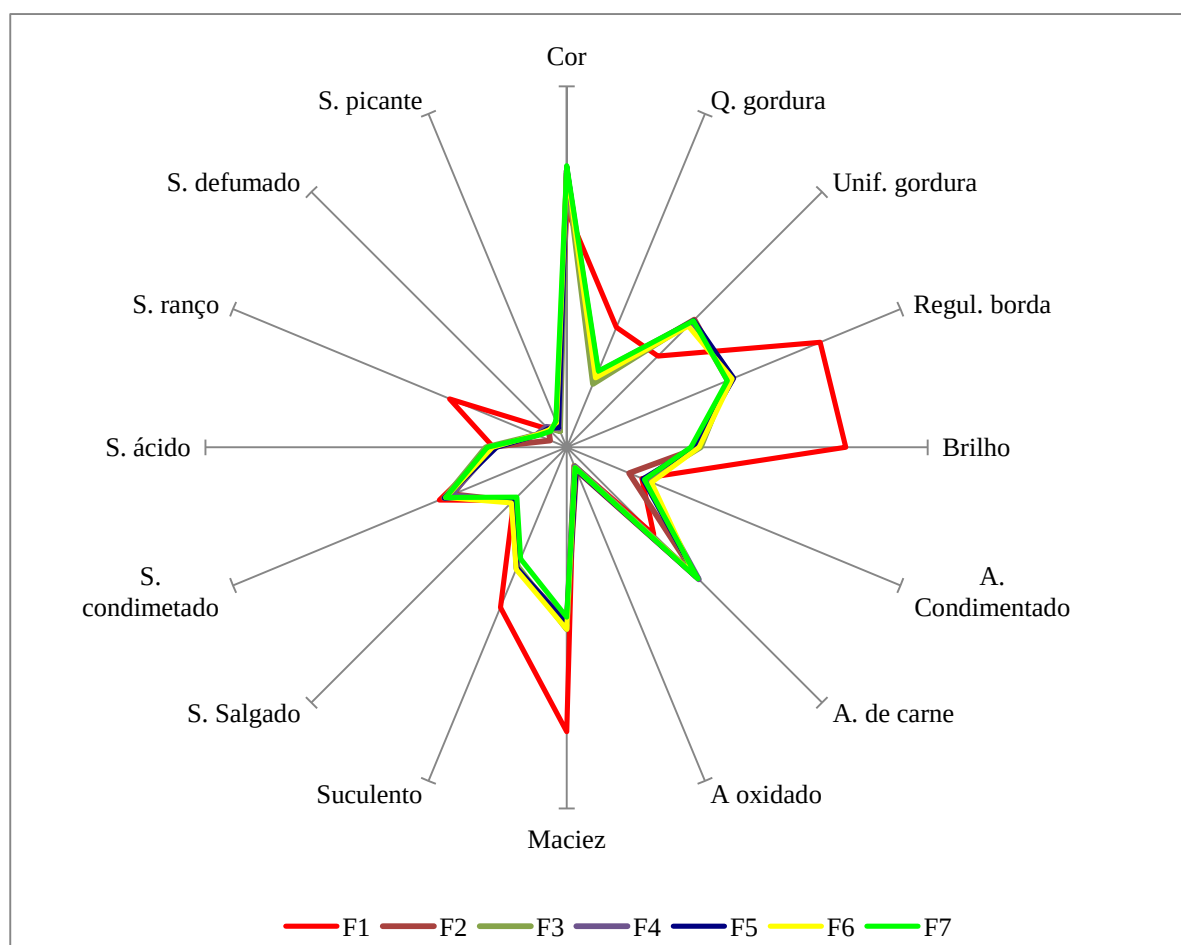
Assessores com p de F repetição > 0,05 foram selecionados.

Figura 10. Avaliação do consenso com a equipe para os atributos cor (A), quantidade de gordura (B), sabor ácido (C) e sabor de ranço (D).



F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e nitrito e nitrato.

Figura 11. Gráfico aranha com as médias dos atributos das amostras de salames.

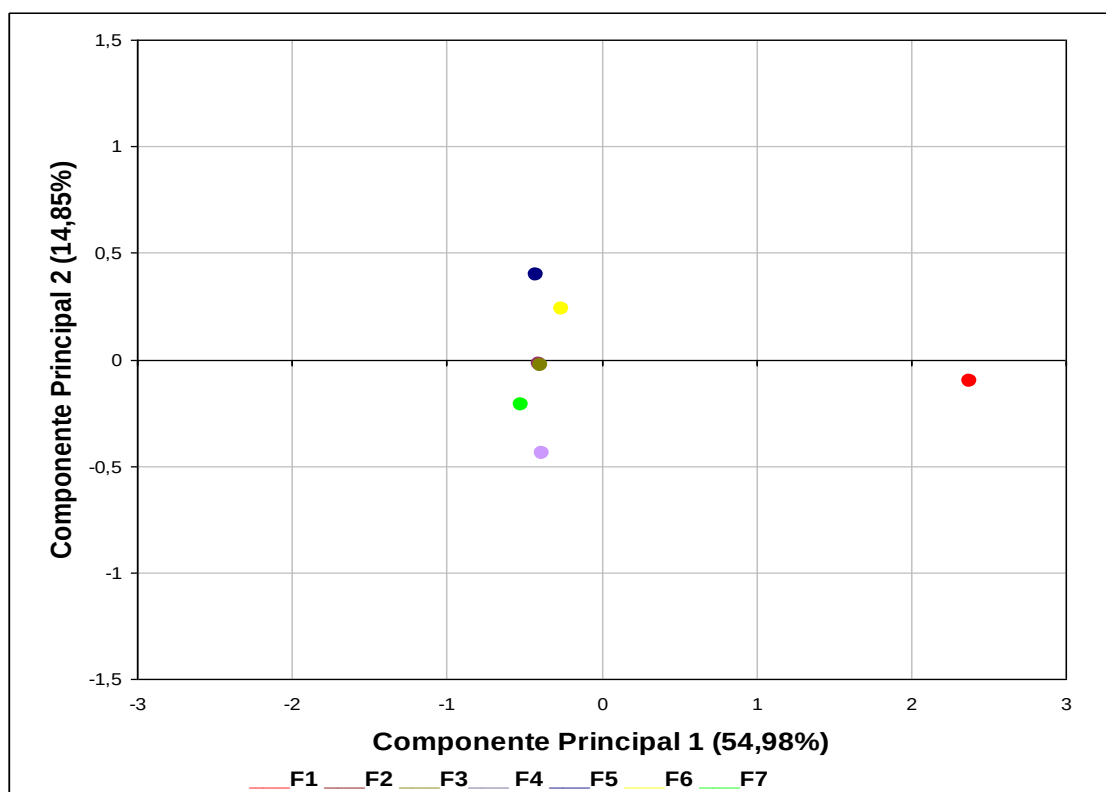


F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E. faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato.

O gráfico de ACP (Figura 12A e 12B) evidencia que 54,98% da variação entre as amostras foi explicada pelo primeiro eixo (CP1) e 14,85% pelo segundo eixo (CP2). A Análise de Componentes Principais separou claramente as formulações com redução de gordura (F2 a F7) da amostra controle (F1), porém, não conseguiu separá-las em função da cepa utilizada e da quantidade de sais de cura. Os atributos CO, MA, PI, CA, SA e COR contribuíram com maior peso para a variabilidade associada ao segundo eixo, enquanto os demais atributos foram os que mais contribuíram para a variabilidade associada ao primeiro eixo. A formulação controle (F1: sem redução de gordura e sais de cura e produzida com culturas tradicionais) exibiu, novamente,

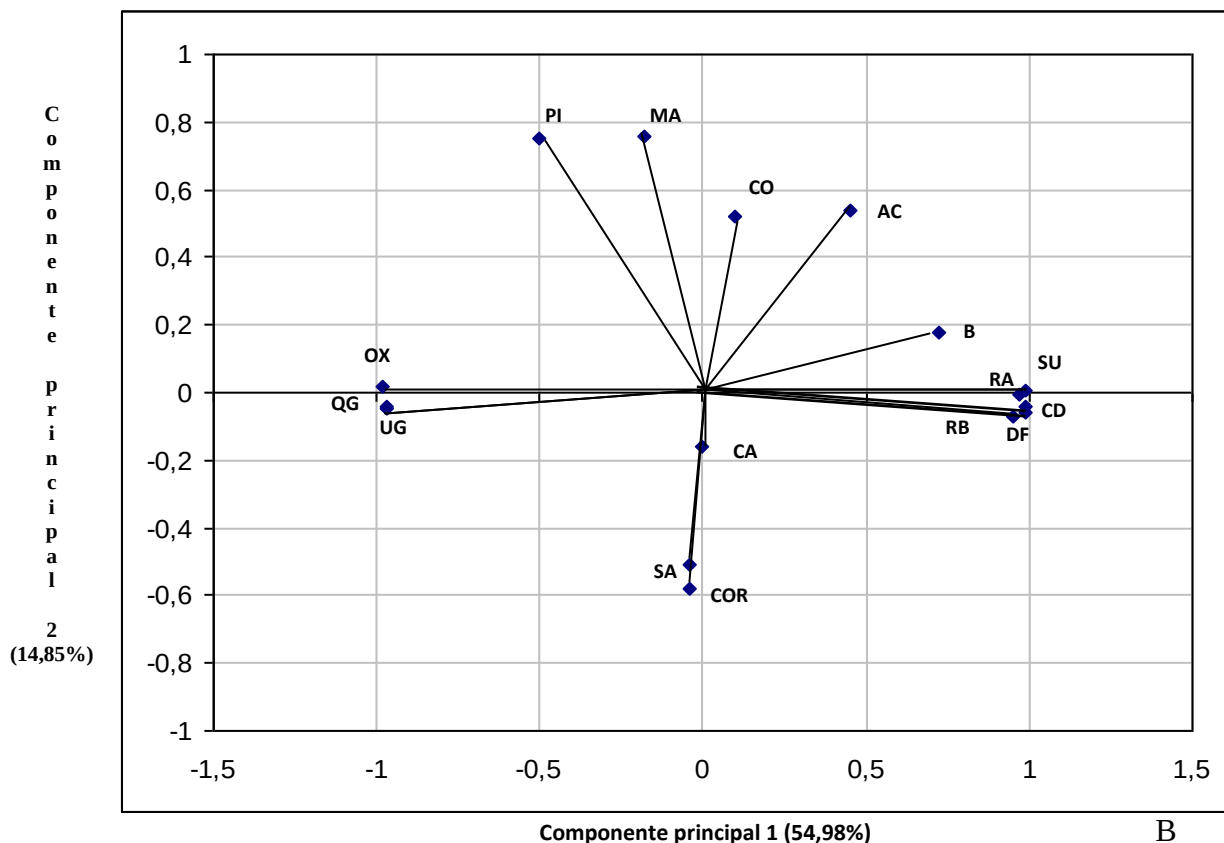
comportamento distinto dos demais, sendo caracterizado pelos atributos B, RA, SU, CD, DF e RB (CP1). As outras formulações ficaram localizadas em regiões mais próximas exibindo as seguintes características: F2, F3 e F7 ficaram localizadas próximas aos vetores OX, QG e UG; F4 próxima aos vetores CA, SA e COR; F5 e F6 ficaram localizadas na região positiva do CP2, próximas aos vetores PI e MA.

Figura 12. Gráfico de ACP das diferentes formulações de embutido cárneo fermentado. A= amostras; B= vetores dos atributos.



A

F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato.



APARÊNCIA: Cor vermelha (COR), Quantidade de gordura (QG), Uniformidade de gordura (UG), Regularidade da borda (RB), Brilho (B); AROMA: Condimentado (CO), De carne (CA), Oxidado (OX); TEXTURA: Maciez (MA), Suculento (SU); SABOR: Salgado (SA), Condimentado, (CD) Ácido (AC), Ranço (RA), Defumado (DF), Picante (PI).

Os gráficos aranha e de ACP apenas sugerem similaridades e diferenças entre as amostras. Os resultados da análise de variância e teste de médias de Tukey (Tabela 17) evidenciaram que não houve diferença significativa entre as formulações para os atributos OX, SA e DF ($p < 0,05$). A formulação F1 (controle) apresentou a maior intensidade para os atributos RB, QG, B, MA e RA e as menores médias para COR, UG e AC, diferindo de todas as outras formulações ($P < 0,05$). A formulação F2 foi a que apresentou menores médias para os atributos aroma e sabor condimentado. Por outro lado, o embutido fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e com redução de sais de cura (F6) foi o mais suculento sem diferir significativamente apenas do controle ($p < 0,05$). Finalmente, a formulação F3 (culturas tradicionais, com redução de gordura e sais de cura) exibiu a maior média para sabor ácido, diferindo apenas da formulação F5 e a menor média para sabor picante diferindo apenas do embutido probiótico F7 ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos na ADQ eram esperados, uma vez que a redução no teor de gordura está envolvida diretamente com a textura do produto (maciez e suculência) e confirmaram os dados instrumentais de textura. A formulação controle F1 (sem redução e gordura) exibiu as maiores médias para sabor de ranço, confirmando os resultados do teste de oxidação onde se verificou que a substituição de gordura animal por óleo de oliva (poliinsaturado) não altera negativamente a oxidação das amostras.

Gómes e Lorenzo (2013) avaliaram o efeito da redução de gordura em um produto típico espanhol, o chorizo. Os resultados evidenciaram diferenças significativas para os atributos coesividade, intensidade de odor e odor de pimenta e para dureza entre as amostras produzidas com e sem redução de gordura de porco.

Os resultados do presente estudo indicam que a redução no teor de nitrito e a substituição das cepas tradicionais por probióticas não alterou a percepção de sabor e aroma das amostras. Apesar da presença de nitrito estar relacionada à cor vermelha característica das carnes curadas (FOX; ACKERMAN, 1968; SEBRANECK; FOX, 1985), não se observou alteração na percepção desse atributo em função da redução de sais de cura. A formulação controle (sem redução de gordura) foi avaliada com menor intensidade de cor vermelha, provavelmente em função da presença de maior quantidade de glóbulos de gordura (branca). A substituição parcial de gordura animal por óleo de oliva foi percebida pelos assessores na análise descritiva, entretanto as variações identificadas não afetaram negativamente a aceitação dos produtos. Mora-Gallego et al. (2013) também avaliaram o efeito da redução e substituição de gordura animal nas propriedades sensoriais e instrumentais de salames fermentados. As formulações com redução de no mínimo 70% de gordura animal (adição de 5% de gordura animal, óleo de girassol ou diacilgliceróis) mostraram comportamentos semelhantes ao controle (sem redução de gordura). A adição de óleo de girassol ainda melhorou as propriedades de aroma, sabor e textura dos produtos.

Tabela 17. Resultados da ADQ (médias $\pm$ DP) das diferentes formulações de embutidos cárneos.

Atributos		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Aparência	Cor (COR)	4,61 ^b $\pm$ 0,21	5,37 ^a $\pm$ 0,24	5,32 ^a $\pm$ 0,17	5,37 ^a $\pm$ 0,26	5,44 ^a $\pm$ 0,25	5,40 ^a $\pm$ 0,26	5,46 ^a $\pm$ 0,32
	Quantidade de gordura (QG)	2,52 ^a $\pm$ 0,26	1,47 ^{bc} $\pm$ 0,23	1,33 ^c $\pm$ 0,18	1,57 ^b $\pm$ 0,20	1,51 ^{bc} $\pm$ 0,28	1,46 ^{bc} $\pm$ 0,26	1,60 ^b $\pm$ 0,23
	Uniformidade de gordura (UG)	2,50 ^b $\pm$ 0,26	3,50 ^a $\pm$ 0,24	3,47 ^a $\pm$ 0,26	3,44 ^a $\pm$ 0,28	3,48 ^a $\pm$ 0,29	3,33 ^a $\pm$ 0,21	3,47 ^a $\pm$ 0,24
	Regularidade da borda (RB)	5,32 ^a $\pm$ 0,25	3,39 ^b $\pm$ 0,24	3,38 ^b $\pm$ 0,22	3,50 ^b $\pm$ 0,20	3,50 ^b $\pm$ 0,19	3,47 ^b $\pm$ 0,25	3,37 ^b $\pm$ 0,30
	Brilho (B)	5,41 ^a $\pm$ 0,23	2,58 ^b $\pm$ 0,28	2,60 ^b $\pm$ 0,18	2,44 ^b $\pm$ 0,29	2,48 ^b $\pm$ 0,28	2,57 ^b $\pm$ 0,28	2,41 ^b $\pm$ 0,23
Aroma	Condimentado (CO)	1,58 ^a $\pm$ 0,24	1,31 ^b $\pm$ 0,22	1,67 ^a $\pm$ 0,33	1,63 ^a $\pm$ 0,32	1,60 ^a $\pm$ 0,32	1,78 ^a $\pm$ 0,35	1,63 ^a $\pm$ 0,34
	De carne (CA)	2,39 ^b $\pm$ 0,28	3,55 ^a $\pm$ 0,30	3,49 ^a $\pm$ 0,27	3,62 ^a $\pm$ 0,25	3,56 ^a $\pm$ 0,27	3,50 ^a $\pm$ 0,31	3,60 ^a $\pm$ 0,21
	Oxidado (OX)	0,38 ^a $\pm$ 0,03	0,48 ^a $\pm$ 0,05	0,39 ^a $\pm$ 0,04	0,40 ^a $\pm$ 0,04	0,47 ^a $\pm$ 0,04	0,43 ^a $\pm$ 0,04	0,43 ^a $\pm$ 0,04
Textura	Maciez (MA)	5,51 ^a $\pm$ 0,22	3,41 ^{bc} $\pm$ 0,23	3,53 ^b $\pm$ 0,24	3,39 ^{bc} $\pm$ 0,23	3,42 ^{bc} $\pm$ 0,22	3,53 ^b $\pm$ 0,22	3,29 ^c $\pm$ 0,19
	Suculento (SU)	3,36 ^a $\pm$ 0,27	2,53 ^{bc} $\pm$ 0,23	2,49 ^{bc} $\pm$ 0,26	2,55 ^b $\pm$ 0,26	2,53 ^{bc} $\pm$ 0,23	2,56 ^a $\pm$ 0,25	2,34 ^c $\pm$ 0,21
Sabor	Salgado (SA)	1,45 ^a $\pm$ 0,19	1,47 ^a $\pm$ 0,19	1,39 ^a $\pm$ 0,18	1,47 ^a $\pm$ 0,26	1,40 ^a $\pm$ 0,18	1,52 ^a $\pm$ 0,28	1,37 ^a $\pm$ 0,24
	Condimentado (CD)	2,67 ^a $\pm$ 0,25	2,38 ^b $\pm$ 0,28	2,57 ^{ab} $\pm$ 0,27	2,43 ^b $\pm$ 0,26	2,57 ^{ab} $\pm$ 0,30	2,54 ^{ab} $\pm$ 0,31	2,54 ^{ab} $\pm$ 0,29
	Ácido (AC)	1,42 ^{ab} $\pm$ 0,24	1,51 ^{ab} $\pm$ 0,19	1,57 ^a $\pm$ 0,21	1,41 ^{ab} $\pm$ 0,24	1,36 ^b $\pm$ 0,19	1,44 ^{ab} $\pm$ 0,23	1,54 ^{ab} $\pm$ 0,28
	Ranço (RA)	2,46 ^a $\pm$ 0,05	0,35 ^c $\pm$ 0,04	0,63 ^b $\pm$ 0,09	0,64 ^b $\pm$ 0,08	0,62 ^b $\pm$ 0,09	0,64 ^b $\pm$ 0,09	0,60 ^b $\pm$ 0,09
	Defumado (DF)	0,49 ^a $\pm$ 0,04	0,50 ^a $\pm$ 0,05	0,53 ^a $\pm$ 0,06	0,56 ^a $\pm$ 0,11	0,51 ^a $\pm$ 0,06	0,48 ^a $\pm$ 0,04	0,44 ^a $\pm$ 0,04
	Picante (PI)	0,46 ^{ab} $\pm$ 0,04	0,44 ^{ab} $\pm$ 0,05	0,34 ^b $\pm$ 0,04	0,40 ^{ab} $\pm$ 0,05	0,42 ^{ab} $\pm$ 0,05	0,52 ^{ab} $\pm$ 0,04	0,55 ^a $\pm$ 0,05

F1 - culturas tradicionais sem redução de gordura e de sais de cura (nitrito 0,015% e nitrato 0,005%), F2 - culturas tradicionais com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato; F3 - culturas tradicionais com redução de gordura e de nitrito e nitrato (nitrito 0,007% e nitrato 0,003%), F4 - cultura probiótica (*Enterococcus faecium* CRL183) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F5 - cultura probiótica (*E.faecium* CRL183) com redução de gordura e de nitrito e nitrato; F6 - cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus* CRL1014) com redução de gordura e sem redução de nitrito e nitrato, F7 - cultura probiótica (*L. acidophilus* CRL1014), com redução de gordura e nitrito e nitrato. Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de médias de Tukey ($p < 0,05$).

Segunda Etapa: Estudo in vitro utilizando um simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH)

Os resultados obtidos na etapa anterior evidenciaram um comportamento muito semelhante entre as diferentes formulações, indicando que a substituição de culturas iniciadoras tradicionais por outras probióticas não influenciou negativamente a qualidade do embutido cárneo. Entre os embutidos com redução de sais de cura e potencialmente probióticos, o produto fermentado com *E. faecium* CRL 183 (F5) apresentou, no final do período de armazenamento, características superiores as do produto fermentado com *L. acidophilus* CRL1014 (F7) – menor população de estafilococos coagulase positiva, menor oxidação lipídica, melhor perfil de textura – sendo por esse motivo selecionado para a segunda etapa do estudo.

5.7 Sobrevivência do *Enterococcus faecium* CRL 183 às condições do estômago e do duodeno e análises microbiológicas

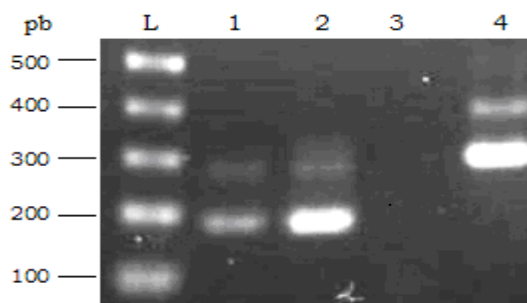
Durante a fase de tratamento foram realizadas análises microbiológicas para verificar a viabilidade do *E. faecium* CRL 183 após a passagem pelos reatores 1 e 2, que simulam o estômago e o duodeno. A amostra de salame (10g) foi adicionada meio basal (210 mL) obtendo-se uma concentração final de 10^8 UFC/mL. As médias da viabilidade de *E. faecium* CRL 183 no salame, no estômago e no duodeno durante as 4 semanas de tratamento foram $8,78 \pm 0,17$; $7,61 \pm 0,06$ e $7,56 \pm 0,35$ log UFC/g, respectivamente, sendo que as viabilidades dos reatores diferiram, estatisticamente, do salame ($p < 0,05$). Observa-se que após a adição do salame ao meio basal, perde-se um ciclo log, que não é alterado após a passagem do estômago para o duodeno, mantendo uma população viável de *E. faecium* CRL 183 suficiente para entrar no primeiro compartimento do cólon (reator 3).

Após confirmação do gênero *Enterococcus* spp. em ágar bile esculina azida, colônias com morfologias distintas foram submetidas à confirmação de espécie por testes moleculares. A Figura 13 exemplifica os diferentes padrões de bandas obtidos.

Após passagem pelos reatores 1 e 2, 75% e 80% das colônias submetidas à análise foram identificadas como pertencentes à cepa CRL183. Esse resultado confirma a resistência da cepa

probiótica, que apresentou redução de apenas um ciclo log em comparação à população presente no salame adicionado ao reator.

Figura 13. Confirmação das amostras por PCR.



L: padrão de tamanho molecular “1kb Ladder Plus” (Invitrogen); 1: controle positivo para cepa CRL183; 2: exemplo de amostra positiva para *E. faecium*, com indicativo de pertencer à cepa CRL183; 3: exemplo de amostra negativa; 4: controle positivo para outra cepa probiótica de *E. faecium* CRL39.

5.8 Análise da composição da microbiota intestinal

Métodos convencionais

A Tabela 18 mostra a população de microrganismos presentes nas amostras retiradas dos reatores 3, 4 e 5, que simulam o cólon ascendente, transverso e descendente, respectivamente, durante todo o período experimental.

As populações de microrganismos aeróbios facultativos e anaeróbios totais não apresentaram diferença estatística ao longo do período experimental, nos diferentes segmentos do cólon. Exceção feita aos aeróbios facultativos no R5, que exibiram aumento de 0,59 ciclo log entre a fase inicial e final de análise.

Quanto à população de *Enterococcus* spp., observou-se um ligeiro aumento na fase de tratamento no reator 3 (0,48 log UFC/mL), com redução significativa de aproximadamente 1,8 ciclos log na fase de pós-tratamento. No reator 4 não houve diferença estatística entre os tempos de tratamento e no reator 5

houve uma redução significativa de 1,27 ciclos log na fase de tratamento, e de 0,7 ciclos log na fase seguinte (pós-tratamento), em comparação com o T0 (controle).

Nos reatores 3 e 5, a população de *Bifidobacterium* spp. se manteve estável na fase de tratamento, com redução significativa na fase seguinte (2,39 e 1,20 log UFC/mL, respectivamente). No reator 4 houve uma redução significativa na população desse gênero de microrganismo nas fases tratamento (0,46 log UFC/mL) e pós-tratamento (1,18 log UFC/mL), em comparação com a fase controle. Estes resultados são contrários aos relatados por Sivieri; Bianchi; Rossi (2011) que observaram aumento significativo de *Bifidobacterium* spp. durante o período de tratamento com *E. faecium* CRL 183, em estudo utilizando o mesmo modelo *in vitro*. No entanto, no referido trabalho a cepa pura de *E. faecium* CRL 183 foi inoculada nos reatores, ou seja, não havia a interferência da matriz alimentar.

Não houve diferença estatística na população de *Clostridium* spp. nos reatores 3 e 4 durante todos os períodos de análise. No reator 5 houve redução significativa da população da fase controle para a fase de pós-tratamento, sendo que a fase de tratamento não diferiu estatisticamente das demais fases. Resultados semelhantes foram encontrados por Sivieri; Bianchi; Rossi (2011) que não observaram nenhuma alteração na população de *Clostridium* spp. durante o período de tratamento com a mesma cepa probiótica.

A população de *Lactobacillus* spp. diminuiu em todos os reatores durante a fase de tratamento. Sendo que nos reatores 4 e 5, cólon transversal e descendente, houve um aumento na fase pós-tratamento, em comparação à fase anterior. Bianchi et al. (2014) estudaram o efeito de uma bebida probiótica à base de extratos de quinoa e soja e fermentada com *Lactobacillus casei* (Lc-01) no ecossistema microbiano intestinal. Os resultados também mostraram redução na população de *Lactobacillus* spp. na fase de tratamento, nos reatores 4 e 5, redução essa que se manteve na fase de pós-tratamento.

Com relação à população de enterobactérias, não houve diferença estatística no reator 3. Nos reatores 4 e 5, houve redução de aproximadamente 0,5 log UFC/mL na fase de tratamento, seguido de novo aumento na fase pós-tratamento.

No período de tratamento a população de *Bacteroides* spp. se manteve sem alteração nos reatores 3 e 4 e exibiu redução de um log no reator correspondente ao cólon descendente (R5). Na fase pós-tratamento observou-se aumento desse gênero em todos os segmentos do cólon.

A composição da dieta é fundamental para a determinação de alterações da microbiota intestinal. Estudos indicam que o consumo de carne vermelha e gordura animal pode resultar em aumento na população de determinados gêneros de microrganismos, envolvidos no desenvolvimento de diferentes patologias (MOORE; MOORE, 1995). Bedani et al. (2010) estudou o efeito da ingestão de dieta à base de carne de vaca na composição da microbiota de ratos saudáveis. Os autores constataram que a ingestão de carne vermelha resultou em aumento na população de microrganismos anaeróbios totais, enterobactérias e *Enterococcus* spp. e redução de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. A administração de um produto à base de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 levou a um aumento na população de *Enterococcus* spp. e *Lactobacillus* e redução de *Bacteroides* spp.

No presente estudo, o consumo do produto cárneo potencialmente probiótico também resultou em redução de *Lactobacillus* spp. e, em menor grau de *Bifidobacterium* (R4 e R5 – fase tratamento), gêneros considerados benéficos para a manutenção da saúde. Por outro lado, ingestão do produto cárneo fermentado com *E. faecium* CRL 183 pode ter inibido o aumento na população de *Bacteroides* spp. e Enterobactérias - gêneros de microrganismos prejudiciais ao homem - pois na fase pós-tratamento observou-se aumento em tais grupos de microrganismos. Em função da complexidade e disponibilidade do equipamento não foi realizado um teste com o produto cárneo sem adição de probiótico, não sendo possível determinar se a cepa probiótica realmente protege o ecossistema microbiano intestinal de mudanças mais drásticas e prejudiciais em sua composição. Testes futuros estão sendo programados para elucidar essa questão.

Tabela 18. Valores médios ($\pm$ desvios padrões) das contagens (log UFC/mL) dos diferentes grupos bacterianos, nos reatores 3, 4 e 5, que simulam o cólon ascendente, transverso e descendente durante o período experimental no simulador do ecossistema microbiano humano.

Grupos de Microrganismos	R3 (Cólon ascendente)		
	Controle	Tratamento	Pós-tratamento
Aeróbios facultativos	8,26 ^a $\pm$ 0,08	8,36 ^a $\pm$ 0,01	8,19 ^a $\pm$ 0,03
<i>Enterococcus</i> spp.	8,36 ^b $\pm$ 0,13	8,84 ^a $\pm$ 0,02	6,59 ^c $\pm$ 0,12
Anaeróbios totais	8,44 ^a $\pm$ 0,23	8,26 ^a $\pm$ 0,05	8,23 ^a $\pm$ 0,04
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,47 ^a $\pm$ 0,08	8,58 ^a $\pm$ 0,14	6,08 ^b $\pm$ 0,05
<i>Clostridium</i> spp.	8,42 ^a $\pm$ 0,01	8,24 ^a $\pm$ 0,46	8,27 ^a $\pm$ 0,10
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,49 ^a $\pm$ 0,09	7,47 ^b $\pm$ 0,47	6,98 ^b $\pm$ 0,06
Enterobactérias	8,19 ^a $\pm$ 0,12	8,25 ^a $\pm$ 0,40	7,57 ^a $\pm$ 0,69
<i>Bacteróides</i> spp.	5,92 ^b $\pm$ 0,97	6,35 ^{ab} $\pm$ 1,04	8,36 ^a $\pm$ 0,15
Grupos de Microrganismos	R4 (Cólon transverso)		
	Controle	Tratamento	Pós-tratamento
Aeróbios facultativos	8,23 ^a $\pm$ 0,09	8,13 ^a $\pm$ 0,01	8,35 ^a $\pm$ 0,01
<i>Enterococcus</i> spp.	7,66 ^a $\pm$ 0,91	7,86 ^a $\pm$ 0,02	7,66 ^a $\pm$ 0,06
Anaeróbios totais	8,64 ^a $\pm$ 0,48	8,15 ^a $\pm$ 0,04	8,57 ^a $\pm$ 0,12
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,54 ^a $\pm$ 0,12	8,08 ^b $\pm$ 0,03	7,36 ^c $\pm$ 0,05
<i>Clostridium</i> spp.	8,58 ^a $\pm$ 0,23	8,05 ^a $\pm$ 0,53	8,47 ^a $\pm$ 0,03
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,46 ^a $\pm$ 0,09	7,03 ^c $\pm$ 0,07	7,51 ^b $\pm$ 0,05
Enterobactérias	8,05 ^{ab} $\pm$ 0,34	7,56 ^b $\pm$ 0,15	8,05 ^a $\pm$ 0,02
<i>Bacteróides</i> spp.	7,47 ^a $\pm$ 0,72	7,33 ^a $\pm$ 0,79	8,42 ^a $\pm$ 0,03
Grupos de Microrganismos	R5 (Cólon descendente)		
	Controle	Tratamento	Pós-tratamento
Aeróbios facultativos	8,04 ^b $\pm$ 0,42	7,92 ^b $\pm$ 0,05	8,63 ^a $\pm$ 0,03
<i>Enterococcus</i> spp.	8,14 ^a $\pm$ 0,21	6,87 ^c $\pm$ 0,02	7,47 ^b $\pm$ 0,03
Anaeróbios totais	8,19 ^a $\pm$ 0,18	8,15 ^a $\pm$ 0,00	8,30 ^a $\pm$ 0,03
<i>Bifidobacterium</i> spp.	8,44 ^a $\pm$ 0,10	8,04 ^a $\pm$ 0,43	7,24 ^b $\pm$ 0,09
<i>Clostridium</i> spp.	8,67 ^a $\pm$ 0,35	8,31 ^{ab} $\pm$ 0,18	7,82 ^b $\pm$ 0,80
<i>Lactobacillus</i> spp.	8,33 ^a $\pm$ 0,13	6,00 ^c $\pm$ 0,38	7,34 ^b $\pm$ 0,03
Enterobactérias	8,40 ^a $\pm$ 0,25	7,87 ^b $\pm$ 0,18	8,07 ^{ab} $\pm$ 0,06
<i>Bacteróides</i> spp.	7,79 ^{ab} $\pm$ 0,24	6,70 ^b $\pm$ 0,91	8,68 ^a $\pm$ 0,05

Médias com letras minúsculas na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

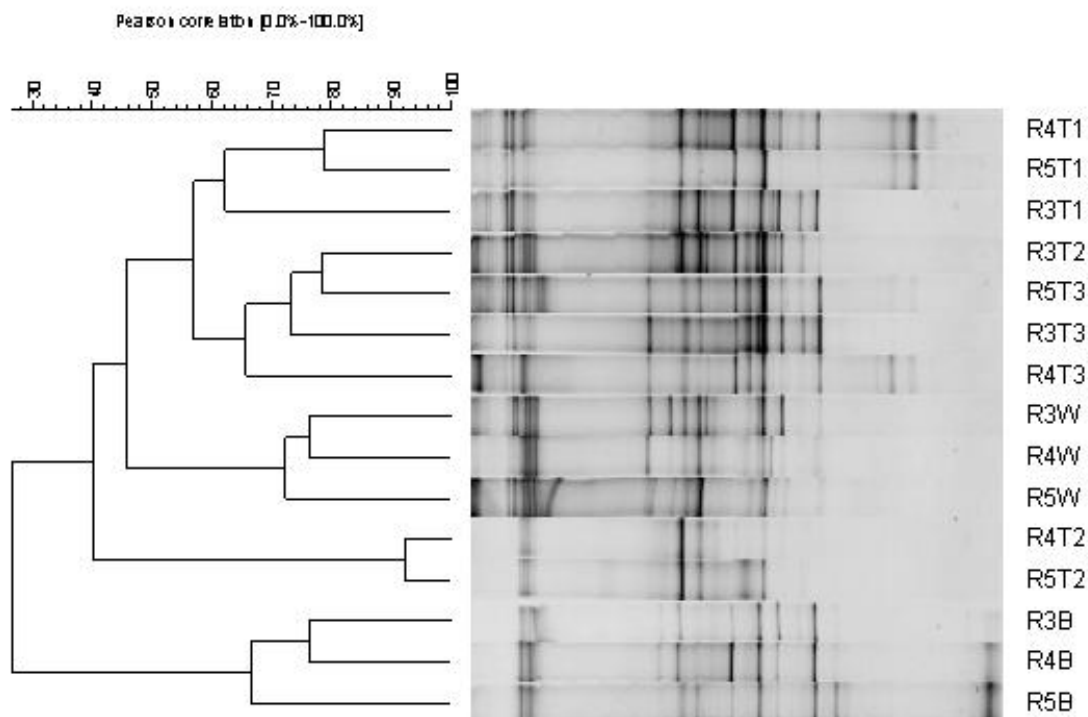
Métodos moleculares – DGGE

A análise de DGGE foi utilizada para monitorar mudanças qualitativas na composição e estrutura da comunidade de bactérias totais nos três compartimentos do simulador do ecossistema microbiano humano.

Para analisar o efeito do consumo do embutido cárneo fermentado na composição da população das bactérias totais nas diferentes porções que simulam o colon intestinal humano foi gerado um dendograma incluindo todo o período experimental (Figura 14).

A análise indicou que o produto contendo *E. faecium* CRL183 teve efeito na composição total da comunidade bacteriana após o período de tratamento, apresentando valores de similaridade superiores a 60% entre as semanas 1 e 3, com exceção dos R4 e R5 na segunda semana de tratamento. Entre as semanas de tratamento e o período pós-tratamento, constatou-se valores de semelhança superiores a 50%, indicando que a cepa *E. faecium* CRL 183 modulou a microbiota natural e essa modificação persistiu após o período de tratamento. O período de pré-tratamento evidenciou menos de 30% de similaridade com o restante do dendograma, confirmando a modificação do sistema após o início da administração do embutido cárneo probiótico.

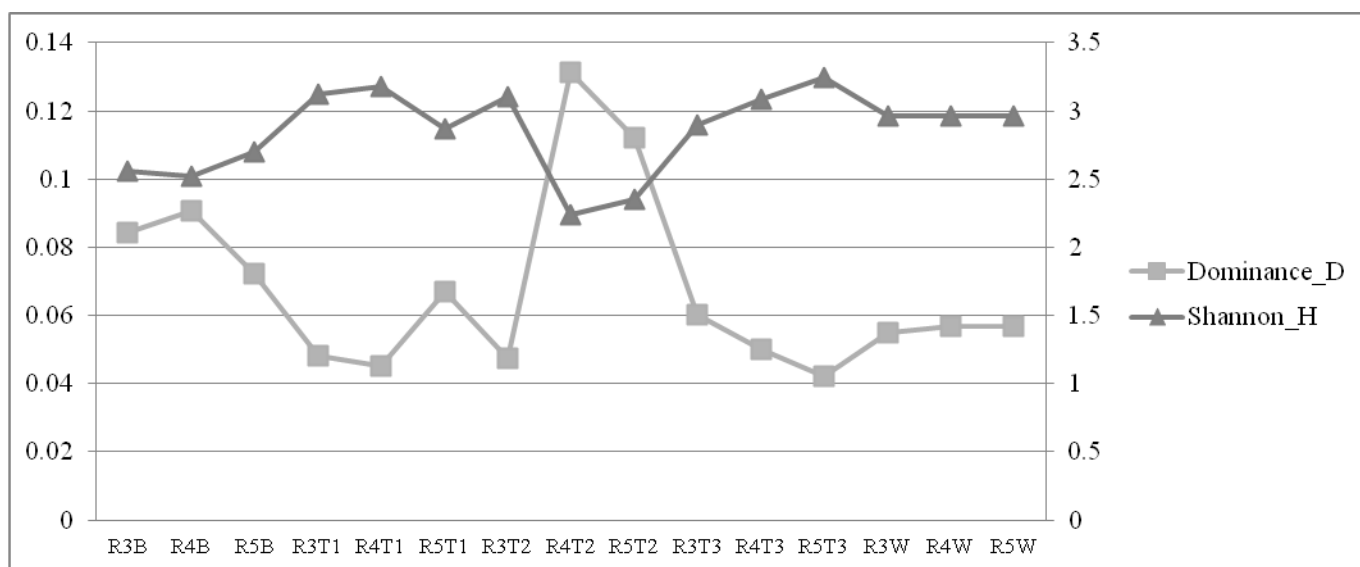
Figura 14. Dendrograma ilustrando a correlação entre os diferentes geis de eletroforese de gradiente desnaturante e os perfis obtidos para as amostras de cada compartimento do colon.



R3B = reator 3, período basal, R4B = reator 4, período basal, R5 = reator 5, período basal; R3T1 = reator 3, primeira semana de tratamento, R4T1 = reator 4, primeira semana de tratamento, R5T1 = reator 5, primeira semana de tratamento; R3T2 = reator 3, segunda semana de tratamento, R4T2 = reator 4, segunda semana de tratamento, R5T2 = reator 5, segunda semana de tratamento; R3T3 = reator 3, terceira semana de tratamento, R4T3 = reator 4, terceira semana de tratamento, R5T3 = reator 5, terceira semana de tratamento; R3W = reator 3, período de pós-tratamento, R4W = reator 4, período de pós-tratamento, R5 = reator 5, período de pós-tratamento.

No gráfico a seguir (Figura 15) são apresentados os resultados do Índice de Shannon (diversidade das espécies) e dominância (relação entre o número de indivíduos de uma determinada espécie e o número de indivíduos de todas as espécies encontradas). Observa-se uma alta dominância nos reatores 4 e 5 na segunda semana de tratamento, sugerindo que o probiótico (*E. faecium* CRL 183) promoveu competição com as outras bactérias presentes no simulador e, provavelmente, reduziu a diversidade microbiana durante esse período. Além disso, verificou-se uma maior diversidade e menor prevalência na distribuição das bactérias totais nos demais reatores durante o período de análise.

Figura 15. Índice de Shannon e dominância.



R3B = reator 3, período basal, R4B = reator 4, período basal, R5 = reator 5, período basal; R3T1 = reator 3, primeira semana de tratamento, R4T1 = reator 4, primeira semana de tratamento, R5T1 = reator 5, primeira semana de tratamento; R3T2 = reator 3, segunda semana de tratamento, R4T2 = reator 4, segunda semana de tratamento, R5T2 = reator 5, segunda semana de tratamento; R3T3 = reator 3, terceira semana de tratamento, R4T3 = reator 4, terceira semana de tratamento, R5T3 = reator 5, terceira semana de tratamento; R3W = reator 3, período de pós-tratamento, R4W = reator 4, período de pós-tratamento, R5 = reator 5, período de pós-tratamento.

Dados da literatura científica mostram que uma microbiota diversificada está relacionada à manutenção da saúde e redução do risco de determinadas patologias (LEPAGE et al., 2011; MANICHANH et al., 2006). Entretanto, se considerarmos doenças específicas, onde a ação do probiótico já foi comprovada, como é o caso do efeito hipolipemiante da cepa *E.faecium* CRL 183 (CAVALLINI et al., 2009; 2011; ROSSI et al., 1994; 2000; 2008), a dominância em relação à microbiota natural do paciente pode ser importante e desejável. Estudos clínicos que relacionem o efeito hipolipemiante da cepa *E.faecium* CRL 183 e a modulação da microbiota intestinal são importantes para a confirmação de tal hipótese.

5.9 Análises de ácidos graxos de cadeia curta e amônia

A Figura 16 representa a produção de AGCC (acético, propiônico e butírico) nos reatores R3 (cólon ascendente), R4 (cólon transverso) e R5 (cólon descendente) nos períodos controle, tratamento e de pós-tratamento.

A produção de AGCC depende do substrato disponível e dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal (BEDANI; ROSSI, 2009).

Observou-se redução na produção de ácido acético em todos os reatores nos diferentes períodos de análise ($p < 0,05$). A produção de ácido propiônico aumentou durante a fase de tratamento no cólon transversal (R4), exibindo diferença significativa em relação aos demais períodos. No período pós-tratamento houve uma queda significativa do valor desse AGCC nos reatores R4 e R5. A produção de ácido butírico foi semelhante nos três reatores, apresentando aumento na fase de tratamento e redução no período pós-tratamento ($p < 0,05$).

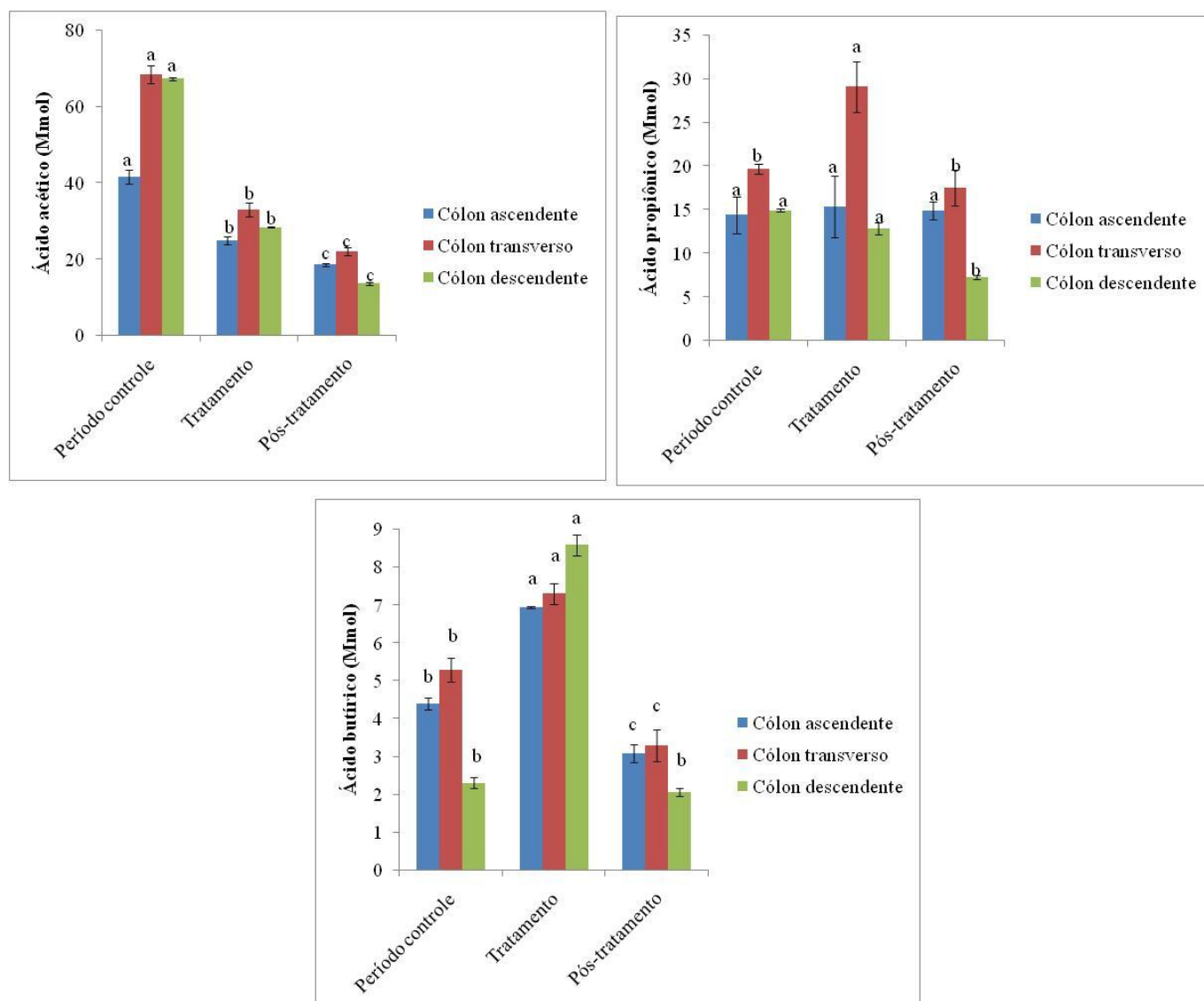
Segundo Topping e Clifton (2001) a concentração de AGCC é uma situação passageira, uma vez que a maioria dos AGCC formados durante a fermentação são, imediatamente, utilizados. Para Macfarlane e Gibson (1994) a formação de AGCC no intestino é dependente de diversos fatores como a composição química, física e a quantidade de substratos disponíveis, que afetam a fermentação bacteriana, que por sua vez, depende do tipo e do número de diferentes populações bacterianas do trato intestinal, bem como a interação competitiva e cooperativa entre as diferentes espécies presentes na microbiota.

A cepa *E. faecium* CRL 183 apresenta efeito modulador do perfil lipídico comprovado em modelos animais e estudos clínicos, e esse fato motivou a sua utilização como cultura iniciadora no produto cárneo fermentado (CAVALLINI et al., 2009a, 2009b; ROSSI et al., 2000; 2003; 2008). A modulação positiva do perfil lipídico envolve: assimilação direta do colesterol, desconjugação de sais biliares e produção ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), capazes de alterar a lipogênese (BEGLEY et al., 2006; PEREIRA; GIBSON, 2002; ZHAO; YANG, 2005). Butirato é considerado uma fonte de energia para os colonócitos auxiliando no processo de regeneração da mucosa intestinal. Acetato é o principal ácido graxo de cadeia curta encontrado no cólon, e, após a absorção, tem sido relacionado ao aumento dos níveis de colesterol, enquanto o propionato reduz a síntese de colesterol. Dessa forma, produtos capazes de reduzir a relação acetato: propionato podem auxiliar no controle dos níveis lipídicos (WONG et al., 2006).

No presente estudo, o produto probiótico estimulou a produção de ácido butírico durante a fase de tratamento em todas as porções do cólon avaliadas e de ácido propiônico no cólon transversal no mesmo período. Por outro lado, promoveu redução na concentração de ácido acético, e esse efeito poderia explicar,

ao menos parcialmente, o efeito hipocolesterolemizante anteriormente observado por nosso grupo de pesquisa, com o uso da mesma cepa probiótica. Entretanto, não é possível afirmar que esse efeito é devido à presença da cepa probiótica, pois, o produto controle (com a utilização de cepas comerciais) não foi ainda avaliado.

Figura 16. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (Mmol) produzidos nos reatores 3, 4 e 5, que simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon no simulador do ecossistema microbiano humano, durante as três fases do período experimental.



Na Tabela 19 são apresentados os resultados da análise de amônia. Os resultados evidenciam produção crescente de íons amônio nas diferentes porções do cólon. Observou-se também aumento significativo na produção desse metabólito nos reatores 4 e 5 durante o período de tratamento, com maior intensidade no reator 5 (cólón descendente). Na semana de pós-tratamento houve redução na produção de íons amônio somente no cólon descendente ($p < 0,05$).

Tabela 19. Concentrações médias ($\pm$ desvios padrões) de íons amônio (ppm) produzidos nos reatores R3, R4 e R5, os quais simulam as regiões ascendente, transversa e descendente do cólon durante o período experimental do simulador do ecossistema microbiano humano.

	R3	R4	R5
Período controle	348,17 ^{aC} $\pm$ 9,91	477,00 ^{bB} $\pm$ 7,04	615,83 ^{cA} $\pm$ 6,43
Tratamento	402,82 ^{aC} $\pm$ 65,29	595,42 ^{aB} $\pm$ 39,57	978,50 ^{aA} $\pm$ 23,78
Pós-tratamento	329,33 ^{aC} $\pm$ 8,02	605,33 ^{aB} $\pm$ 15,18	883,00 ^{bA} $\pm$ 10,58

Médias com letras minúsculas na mesma coluna e, médias com letras maiúsculas na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados encontrados são semelhantes aos descritos por Sivieri et al. (2011) que investigaram os efeitos do *Enterococcus faecium* CRL 183 na capacidade fermentativa da microbiota do cólon utilizando o SEMH, onde observou-se aumento na produção de íons amônio em todos os reatores durante o período de tratamento.

Nota-se que R3 e R5 apresentaram as menores e as maiores quantidades de íons amônio, respectivamente, independente do período experimental, assim como Possemiers et al. (2004) descreveu. Macfarlane et al. (1992) sugerem que a concentração de íons de amônia no intestino aumenta, progressivamente, do cólon ascendente para o descendente, devido a maior taxa de fermentação de proteínas (DAVILA et al., 2013).

Resultados de Bedani et al (2011), sugerem que o *E. faecium* CRL 183 pode contribuir para o aumento do teor de íons amônio, quando o consumo deste microrganismo está associado com uma dieta de proteína à base de carne. Uma das enzimas responsáveis pela produção de íons amônio é a urease (KIM, et al, 1998). Simonova et al. (2005) estudaram 29 cepas de *E. faecium* e verificaram que todos mostraram atividade ureolítica.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram claramente que foi possível obter um produto cárneo fermentado, potencialmente probiótico, utilizando culturas iniciadoras que apresentam propriedades hipolipemiantes anteriormente comprovadas. A redução no teor de nitrito e a substituição das culturas tradicionais por outras probióticas não comprometeu a segurança microbiológica e não alterou negativamente as características físico-químicas dos embutidos.

A substituição parcial de gordura animal por óleo de oliva resultou em aumento de dureza, fato que não alterou a aceitação hedônica global das amostras. A ADQ não foi capaz de diferenciar as amostras em função da cepa utilizada e da quantidade de sais de cura adicionada.

Entre as formulações testadas, a F5 (fermentado com *E.faecium* CRL 183, com redução de gordura e sais de cura) mostrou-se a mais interessante sob o ponto de vista nutricional e tecnológico, apresentando: teor total de aminas bioativas baixo e mais estável em função do tempo, quando comparada as demais formulações; melhor perfil de textura (instrumental) durante o período de armazenamento e menor índice de oxidação (TBARS).

Os testes utilizando o simulador do ecossistema microbiano humano (SEMH) evidenciaram que o consumo do produto fermentado com *E.faecium* CRL 183 com redução de gordura e sais de cura (F5 – fase tratamento) pode resultar em redução de *Lactobacillus* spp. (cólon ascendente, transverso e descendente), *Bacteroides* spp. (cólon descendente) e enterobactérias (cólon transverso e descendente) e aumento nos níveis de íons amônio. O mesmo produto probiótico estimulou a produção de ácido butírico e propiônico e reduziu a concentração de ácido acético durante a fase de tratamento, além de reduzir a diversidade e aumentar a dominância na população de microrganismos intestinais.

Tais resultados indicam que o salame utilizado no estudo *in vitro* (F5) constitui uma alternativa mais saudável de produto cárneo fermentado, pois além de possuir características nutricionais mais interessantes, apresenta potencial para atuar na modulação do perfil lipídico, por

meio da melhora na produção de AGCC e modulação da microbiota com aumento da população de *E. faecium* CRL 183 que é uma cepa comprovadamente hipocolesterolemiantes.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, M.R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, v.8, p.227-239, 1997.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, de 10 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://e legis.anvisa.gov.br/leisref/public/>>. Acesso em: 23 set. 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdac5c80474597399f7ddf3fbc4c6735/rdc_02.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 20 jan. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 25 de out de 2013.

ALAKOMI, H.L.; SKYTTÄ, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I.M. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disturbing the outer membrane. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.2001-2005, 2000.

ALVES, L. B.; BELDERRAIN, M. C. N.; SCARPEL, R. A. **Tratamento multivariado de dados por análise de correspondência e análise de agrupamentos**. In: Encontro de iniciação científica e pós-graduação do ITA - XII ENCITA, 13, 2007, São José dos Campos. Anais do 13º Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do ITA – XIII ENCITA, São José dos Campos, 2007.

AMERINE, M.A.; PANGBORN, R.M.; ROESSLER, E.B. **Principles of sensory evaluation of food**. New York: Academic Press, 1965. 602 p

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, p. 138-146, 2007.

ANDRES, S.; ZARITZKY, N.; CALIFANO, A. The effect of whey protein concentrates and hydrocolloids on the texture and colour characteristics of chicken sausages. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.954-961, 2006.

AOCS. OFFICIAL METHODS AND RECOMMENDED PRACTICES OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, Champaign, 2004.

AOAC, ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis, 16^a ed. Arlington: AOAC, 2005.

ARNAU, J.; SERRA, X.; COMAPOSADA, J.; GOU, P.; GARRIGA, M. Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. **Meat Science**, v.77, n.01, p.81-89, 2007.

ARIHARA, K.; ITOH, M. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 227-230, 2000.

ARIHARA, K. Strategies for designing novel functional meat products. **Meat Science**, v.74, n.1, p. 219-229, 2006.

AYHAN, K.; KOLSARICI, N.; ÖZKAN, G. A. The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. **Meat Science**, v.53, p. 183–188, 1999.

BACKES, A.M.; TERRA, N.N.; MILANI, L.I.G; REZER, A.P.S; LÜDTKE, F.L.; CAVALHEIRO, C.P.; FRIES, L.L.M. **Características físico-químicas e aceitação sensorial de salame tipo Italiano com adição de óleo de canola**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 6, supl. 2, p. 3709-3720, 2013.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v.6, p.341-346, 1995.

- BEDANI, R. **Influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos**. 2008. 122f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição- Ciência dos Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- BEDANI, RAQUEL ; PAULY-SILVEIRA, NADIÉGE D ; ROSELINO, MARIANA N ; DE VALDEZ, GRACIELA F ; ROSSI, ELIZEU A . Effect of fermented soy product on the fecal microbiota of rats fed on a beef-based animal diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 233-238, 2010.
- BEDANI, R. ; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: implicações para o câncer de cólon. GE. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 15, p. 250-259, 2009.
- BEDANI, R.; PAULY-SILVEIRA, NADIÉGE D ; CANO, V.P. ; VALENTINI, S.R ; VALDEZ, G. F. ; ROSSI, E. A. Effect of ingestion of soy yogurt on intestinal parameters of rats fed on a beef-based animal diet. **Brazilian Journal of Microbiology** (Impresso), v. 42, p. 1238-1247, 2011.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1729–1738, 2006.
- BERKEL, B.M.V.; BOOGAARD, B.V.D.; HEIJNEN, C. **Conservação de peixe e carne**. Wageningen, Países Baixos: Digigrafi, 2005, p.97.
- BIANCHI, F.; ROSSI, E.A.; SAKAMOTO, I.K.; ADORNO, M.A.T.; WIELE, T.V.; SIVIERI, K. Beneficial effects of fermented vegetal beverages on human gastrointestinal microbial ecosystem in a Simulator. **Food Research International**, v.64, p.43–52, 2014.
- BISHOP, D.J.; OLSON, D.G.; KNIPE, C.L. Pre-emulsified corn oil, pork fat, or added moisture affect quality of reduced fat bologna quality. **Journal of Food Science**, v.58, n.3, p.484-487, 1993.
- BLOUKAS, J.G.; PANERAS, E.D. Substituting olive oil pork backfat affects quality of low fat frankfurters. **Journal of Food Science**, v.58, n.4, p.705-709, 1993.
- BLOUKAS, J.G.; PANERAS, E.D.; FOURNITZIS, G.C. Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. **Meat Science**, v.45, n.2, p.133-144, 1997.

BOMDESPACHO, L. Q.; CAVALLINI, D.C.U.; DE CASTRO, A.D. ROSSI, E.A. O emprego de Okara no processamento de hambúrguer de frango fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 1-1, 2011.

BOURNE, M. C. Texture profile analysis. **Food Technology**, v.32, p.62- 66,72, 1976.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 33–41, 1999.

BOVER-CID, S., IZQUIERDO-PULIDO,M.,AND VIDAL-CAROU, M. C. Influence of hygienic quality of raw materials on biogenic amine production during ripening and storage of dry fermented sausages. **Journal of Food Protection**, v.63, p.1544–1550, 2000a.

BOVER-CID, S., HUGAS, M., IZQUIERDO-PULIDO, M., VIDAL-CAROU, M.C. Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid- decarboxylase starter culture for fermentation of Fuet sausages. **Journal of Food Protection**, v.63, p.237–243, 2000b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1002/1004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento técnico de atribuição de função de aditivos, e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – Carne e produtos cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 e dezembro de 1998. Seção 1. p.29.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa no. 22 de 31 de julho de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade de Qualidade de Salames. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 de agosto de 2000. p. 15-28.

BRIGIDI, P; VITALI,B; SWENNEN, E; BAZZOCCHI, G; MATTEUZZI, D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. **Research in Microbiology**, v. 152, n.8, p. 735-74, 2001.

CACCIOPPOLI, J.; CUSTÓDIO, F.B.; VIEIRA, S.M.; COELHO, J.V.; GLÓRIA M.B.A. Aminas bioativas e características físico-químicas de salames tipo italiano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.648-657, 2006.

CALLEWAERT, R.; HUGAS, M.; DE VUYST, L. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococci in the production of Spanish-style dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.57, p.33–42, 2000.

CAMPAGNOL, P. C. B.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. Considerações na elaboração de salame. **Revista Nacional da Carne**, v.362, p37- 42, 2007.

CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P.E. **Fermented Meat**. 1st ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995.

CANDOGAN, K., KOLSARICI, N. The effects of carrageenan and pectin some quality characteristics of low-fat beef frankfurters. **Meat Science**, v.64, p.199–206, 2003.

CANDOGAN, K.; KOLSARICI, N. Storage stability of low-fat beef frankfurters formulated with carrageenan or carrageenan with pectin. **Meat Science**, v.64, p. 207-214, 2003a.

CANO, V.P.S.; VALENTINI, S.R.; SIVIERI, K., ROSSI, E.A. Demonstration of the cellular viability and safety of Enterococcus faecium CRL183 in long-term experiments. **Le Lait**, v. 87, p. 59-69, 2007.

CAVALLINI, D.C.U., ABDALLA, D.S., VENDRAMINI, R.C., BEDANI, R., BOMDESPACHO, L.Q., PAULY-SILVEIRA, N.D., DE VALDEZ, G.F., ROSSI, E.A. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health Disease**, v.8, n.40, 2009.

CAVALLINI, D.C.U. **Efeito do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* e suplementado com isoflavonas nos marcadores laboratoriais de risco cardiovascular e na aterosclerose**. 2009. 140f. Relatório (Pós-doutorado) – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

CAVALLINI, D.C.U.; BEDANI, R.; PAULY, N.D.; BONDESPACHO, L.Q.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Lipids in Health and Disease**, v.8, n.1, 2009a.

CAVALLINI, D.C.U.; D.S.P. ABDALLA; VENDRAMINI, R.C.; BEDANI, R.; BONDESPACHO, L.Q.; PAULY-SILVEIRA, N. D.; VALDEZ, G.F.; ROSSI, E.A. Effects of isoflavone-supplemented soy yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic rabbits: a randomized double-blind study. **Lipids in Health and Disease**, v.8, n.40, 2009b.

CAVALLINI, D.C.U.; SUZUKI, J.Y.; ABDALLA, D.S.P.; VENDRAMINI, R.C.; PAULY-SILVEIRA, N.D.; ROSELINO, M.N.; PINTO, R.A.; ROSSI, E.A. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. **Lipids in Health and Disease**, v.10, n.126, 2011.

CHOI, Y.S.; CHOI, J.H.; HAN, D.J.; KIM, H.Y.; LEE, M.A.; KIM, H.W.; LEE, J.W.; KIM, C.J. Optimization of replacing pork back fat with grape seed oil and rice bran fiber for reduced-fat meat emulsion systems. **Meat Science**, v.84, p.212-218, 2010.

CHOI, Y.S.; CHOI, J.H.; HAN, D.J.; KIM, H.Y.; LEE, M.A.; KIM, H.W.; JEONG, J.Y.; KIM, C.J. Characteristics of low-fat meat emulsion systems with pork fat replaced by vegetable oils and rice bran fiber. **Meat Science**, v.82, p.266-271, 2009.

CIERACH, M.; MODZELEWSKA-KAPITUŁA, M.; SZACILO, K. The influence of carrageenan on the properties of low-fat frankfurters. **Meat Science**, v.82, p.295-299, 2009.

CODEx ALIMENTARIUS. Current official standards - Codex Stan (210) (1999) "Standard for named vegetable oils" e "Standard for fats and oils not covered by individual standards". Revised, 2009. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=336

COISSON, J.D.; CERUTTI, C.; TRAVAGLIA, F., ARLORIO, M. Production of biogenic amines in "Salamini italiani alla cacciatora PDO". **Meat Science**, 67, 343-349, 2004.

COLORETTI, F., CHIAVARI, C., ARMAFORTE, E., CARRI, S., CASTAGNETTI, G.B. Combined use of starter cultures and preservatives to control production of biogenic amines and improve sensorial profile in low-acid salami. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.11238-11244, 2008.

COMAN, M.M., CECCHINI, C., VERDENELLI, M.C., SILVI, S., ORPIANESI, C., CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.346–352, 2012.

DAMÁSIO, M. H., COSTELL, E. Análisis sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadores. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v.31, p.165-178, 1991.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010, p.900.

DAVILA, A-M.; BLACHIERA, F.; GOTTELAND, M.; MIREILLE ANDRIAMIHAJA, M.; BENETTIA, P-H.; SANZC, Y.; TOMÉ, D. Intestinal luminal nitrogen metabolism: Role of the gut microbiota and consequences for the host. **Pharmacological Research**, v.68, n.1, p.95-107, 2013.

DEEGAN, L.H., COTTERA, P.D., HILLA, C., ROSS, P. Bacteriocins: biologicals tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**., v.16, p.1058-1071, 2006.

DE LA MONTE, S.M.; NEUSNER, A.; CHU, J.; LAWTON, M. Epidemiological trends strongly suggest exposures as etiologic agents in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease, diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.17, p.519-529, 2009.

DEMEYER, D. I.; VERPLAETSE, A.; GISTELINCK, M. Fermentation of meat: an integrated process. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 41, 131-139, 1986.

DEL NOBILE, M. A. CONTE, A., INCORONATO, A.L., PANZA, O., SEVI, A., MARINO, R. New strategies for reducing the pork back-fat content in typical Italian salami. **Meat Science**, v. 81, p. 263-269, 2009.

DE VUYST, L.; FALONE, G.; LEROY, F. Probiotic in fermented sausage. **Meat Science**, v.80, p.75-78, 2008.

DICKS, L.M.T.; MELLET, F.D.; HOFFMAN, L.C. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. **Meat Science**, v.66, p.703-708, 2004.

DJORDJEVIC, D.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Oxidative stability of whey protein-stabilized oil in water emulsions at pH 3: potential omega-3 fatty acid delivery systems. **Journal of Food Science**, v.69, n.5, p.352-362, 2004.

DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of methods for microbiological examination of foods. American Public Health Association. 4.ed. Washington, D.C.: Sheridan Books, 2002. p.659.

DRANSFIELD, E. The taste of fat. **Meat Science**, v.80, p.37-42, 2008.

EDLUND, C.; BEYER, G.; HIEMER-BAU, M.; ZIEGE, S.; LODE, H.; NORD, C. E. Comparative effects of mixifloxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.32, n.1, p.81-85, 2000.

EEROLA, S.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; LILLEBERG, L., AALTO, H. Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, v.205, p.351-355, 1997.

ELIAS, M.; MARINHO, A.; PALMA, V.; SANTOS, C.; ROSEIRO, C. **The influence of the starter cultures in the production of regional Portuguese sausage – microbiological, physical and chemical properties.** In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY (ICoMST), 49., 2003, Campinas. Proceedings... Campinas, 2003. p.485-486.

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., PETÄJÄ, E., EEROLA, S., LILLEBERG, L., MATTILA-SANDHOLM, T., SUIHKO, M.L. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter culture. **Meat Science**, v.58, p.111-116, 2001.

EXPONENT LITE Software: introduction to texture analysis. Version 4,5 [SI]: TA-XTPlus, Stable Micro Systems, 2009, 1 CD-ROM.

FADDA, S.; VIGNOLO, G.; OLIVER, G. Tyramine degradation and tyramine/ histamine production by lactic acid bacteria and Kocuria strains. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 2015–2019, 2001.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. Joint of FAO/WHO Working Group. Report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, p.1-9, 2002.

FERNANDEZ, C. G.; SANTOS, E. M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Use of starter cultures in dry fermented sausage (chorizo) and their influence on the sensory properties. **Food Science and Technology International**, London, v. 3, p. 31-42, 1997.

FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e procissão**. Viçosa, MG, 2003. 206p.

FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497–509, 1957.

FONSECA, S. H. **Sobrevivência de *Listeria innocua* em salame italiano**. 1999. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

FOX JR, J. B.; ACKERMAN, S. A. Formation of nitric oxide myoglobin: mechanisms of the reaction with various reductants. **Journal of Food Science**, v. 33, n. 4, p. 364-370, 1968.

FROSI, V. **Nível tecnológico da produção de fermentados no Brasil**. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). Anais SBCTA, Porto Alegre. p. 3915-3917, 2002.

- FUCHS, R.H.B.; BORSATO, D.; BONA, E.; HAULY, M.C.O. “Iogurte” de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p. 175-181, 2005.
- 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**, Campinas, v. 3, n. 48, p. 151-158, 2000.
- GLASS, K.A.; ZHAO, T.; DOYLE, M.P. Fate of Escherichia coli O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented sausage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2513-2516, 1992.
- GLORIA, M.B.A. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. Handbook of food Science. New York: Marcel Dekker, 2005. cap.13, p.38.
- GÓMEZ, M.; LORENZO, J.M. Effect of fat level on physicochemical, volatile compounds and sensory characteristics of dry-ripened "chorizo" from Celta pig breed. **Meat Science**, v.95, n.3, p. 658-66, 2013.
- GONZALES-FERNANDEZ, C.; SANTOS, E.M.; JAIME, I.; ROVIRA, J. Influence of starter cultures and sugar concentrations on biogenic amine contents in chorizo dry sausage. **Food Microbiology**, v.20, p.275-284, 2003.
- GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, p.1055 – 1058, 1978.
- GUINANE, C.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p. 1316-1325, 2005.
- GUNSTONE, F.D., HARWOOD, J.L. **Occurrence and characterization of oils and fats**. In: Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ eds. The Lipid Handbook. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.37-52.
- HARTMAN, L., LAGO, R.A.C. **Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids**. Laboratory Practice Journal, v.22, p.475 – 476, 1973.

HAYES, S.C., BARNES-HOLMES, D., ROCHE, B. (Eds.) **Relational frame theory: a post-skinnerian account of human language and cognition**. New York: Plenum Press, 2001.

HEILIG, H. G. H. J.; ZOETENDAL, E. G.; VAUGHAN, E. E.; MARTEAU, P.; AKKERMANS, A. D. L.; DE VOS, W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.1, p.114–123, 2002.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUÉS, M.T., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.45, p.2098-2102, 1997a.

HERNÁNDEZ-JOVER, T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VECIANA-NOGUÉS, M.T., MARINÉ-FONT, A., VIDAL-CAROU, M.C. Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. **Journal of Food Protection**, v.60, p.825-830, 1997b.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p.506–514, 2014.

HOOGENKAMP, H.W. Low-fat and low-cholesterol sausages. **Fleischerei**, v.40, n.11, III-IV, 1989a.

HOOGENKAMP, H.W. Low-calorie sausages, spreads and mouses, **Fleischerei**, v.40, n.10, III-IV, 1989b.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T.; MONFORT, J.M. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, p.322–330, 1995.

INOUE, N., OHARA, Y., FUKAI, T., HARRISON, D.G., NISHIDA, K. Probucol improves endothelial-dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in cholesterol-fed rabbits. **The American Journal of the Medical Sciences**, v.315, n.4, p. 242-247, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo, p.60, 2005.

JAY, J. **Microbiología Moderna de los Alimentos**. 3 ed. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 804.

JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-fats. **Trend in Food Science & Technology**, v.18, n.1, p.567-578, 2007.

JUDGE, M. D.; ALBERLE, E.D.; FORREST, J.C. **Principles of Meat Science**. 2ed. Duburque. Kendall/Hunt, 1989. p.351.

KAREL, M., YOUNG, S. **Autoxidation-initiated reactions in foods**. In: ROCKLAND, L.B., STEWART, G.F. (Eds.) Water activity: influences on food activity. Academic Press, 1981. p.511.

KAYAARDI, S.; GÖK, V. Effect of replacing beef fat with olive oil on quality characteristics of Turkish soudjouk (sucuk), **Meat Science**, v.66, n.1, p.249-257, 2003.

KEETON, J.T. Low-fat meat products – Technological problems with processing. **Meat Science**, v.36, p.261-276, 1994.

KINOUCHI, F.L. **“Iogurte” de soja como coadjuvante no tratamento de cancer de mama**. 2006. 85f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

KOUTSOPOULOS, D.A.; KOUTSIMANIS, G.E.; BLOUKAS, J.G. Effect of carrageenan level and packaging during ripening on processing and quality characteristics of low-fat fermented sausages produced with olive oil. **Meat Science**, v.79, p.188-197, 2008.

LANGA, S.; FERNÁNDEZ, A.; MARTÍN, R.; REVIRIEGO, C.; MARÍN, M.L.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Differentiation of *Enterococcus faecium* from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains by PCR and dot-blot hybridization. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, p.197-200, 2003.

LAPA-GUIMARÃES, J. **Aminas biogênicas, aminas voláteis, triptofano livre e ureia como índices químicos de qualidade e frescor do pescado**. 2005. 125f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.181-186, 2000.

LEPAGE, P.; HÄSLER, R.; SPEHLMANN, M. E; REHMAN, A.; ZVIRBLIENE, A.; BEGUN, A.; OTT, S.; KUPCINSKAS, L.; DORÉ, J.; RAEDLER, A.; SCHREIBER, S. Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis. **Gastroenterology**. v.141, p.227-236, 2011.

LEROY, F.; DE VUYST, L.D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, p.67-78, 2004.

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

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.1683-1688, 1991.

LIAROS, N.G.; KATSANIDIS, E.; BLOUKAS, J.G. Effect of the ripening time under vacuum and packaging film permeability on processing and quality characteristics of low-fat fermented sausages. **Meat Science**, v.83, p.589-598, 2009.

LIVINGSTON, S. J.; KOMINOS, S. D.; YEE, R. B. New medium for selection and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. **Journal of Clinical Microbiology**, v.7, n.5, p.448-453, 1978.

LÜCKE, F. K. Microbial processes in the manufacture of dry sausages and raw ham. **Fleischwirtschaft**, v.66, p.1505–1509, 1986.

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

MACEDO, R.E.F.; PFLANZER Jr, 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, R.E.F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo**. 210f. (Tese de Doutorado) em Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

MACFARLANE, G.T.; GIBSON, G.R.; CUMMINGS, J.H. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, n.1, p.57–64, 1992

MACFARLANE, G.T.; GIBSON, G. R. **Metabolic interactions between colonie bacteria and the host**. In: Human Health: the contribution of microorganisms (Gibson, S.A.W., Å©d.), Springer-Verlag, London, 1994. p.17-52.

MANICHANH, C.; RIGOTTIER - GOIS, L.; BONNAUD, E.; GLOUX, K.; PELLETIER, E.; FRANGEUL, L.; NALIN, R.; JARRIN, C.; CHARDON, P.; MARTEAU, P.; ROCA, J.; DORE, J. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. **Gut**, v.55, n.2, p.205-211, 2006.

MARANGONI, C. **Atividade antioxidante do óleo essencial de coentro (*Coriandrum sativum* L.) em salame italiano**. 2007. 130f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Chapecó, 2007.

MARTINS, D. I.; MIDIO, A. F. **Toxicologia dos alimentos**. 2 Ed. São Paulo: Varela, 2000.

MARZOTTO, M.; MAFFEIS, C.; PATERNOSTER, T.; FERRARIO, R.; RIZZOTTI, L.; PELLEGRINO, M.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. *Lactobacillus paracasei* a survives

gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of health infants. **Research in Microbiology**, v.157, p.857-866, 2006.

MENEZES, R.S.; LELES, M.I.G.; SOARES, A.T.; FRANCO, P.I.B.E.M.; ANTONIOSI FILHO, N.R.; SANT'ANNA, C.L.; VIEIRA, A.A.H. *Quim. Nova*, v.36, n.10, p.10-15, 2013.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. *Sensory evaluation techniques*. 3rd ed. New York: Boca Raton, 1999. 387 p.

MIGUEL, D.P. Desenvolvimento de sorvete e iogurte simbiótico à base de extrato aquoso de soja e de yacon (*Smallantus sonchifolia*) fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. 2009. 112f. (Tese de Doutorado) em Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara.

MOLLY, K.;VANDEWOESTYNE,M.; DESMET, I.; VERSTRAETE,W. Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism associated activities. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.7, n. 4, p. 191–200, 1994.

MOLLY, K.; WOESTYNE, M.V.; VERSTRAETE, W. Development of a 5-step multichamber reactor as a Simulation of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. **Applied and Microbiology Biotechnology** v. 39, p. 254–258,1993.

MONTEL, M. C., MASSON, F., TALON, R. Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. **Sciences des Aliments**, v.19, p.247–254, 1999.

MOORE, WE; MOORE, LH. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v.91, p.3202–3207, 1995.

MORA-GALLEGU; H.; SERRA, X. ; GUARDIÃ, M.D.; MIKLOS, R.; LAMETSCH, R; ARNAU, J. Effect of the type of fat on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics of reduced fat non-acid fermented sausages. **Meat Science**, v.93, p.668–674, 2013.

MOSKOWITZ, H. R. *Product testing and sensory evaluation of foods*. Westport: Food & Nutrition Press; Sebranek, J. G.; Fox, J. B., Jr. A review of nitrite and chloride chemistry: interactions and

implications for cured meats. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 1169-1182, 1985.

MUGUERZA, E.; GIMENO, O.; ANSORENA, D.; BLOUKAS, J.G.; ASTIASARAN, I. Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona - a traditional Spanish fermented sausage. **Meat Science**, v.59, p. 251-258, 2001.

MUGUERZA, E.; FISTA, G.; ANSORENA, D.; ASTIASARAN, I.; BLOUKAS, J.G. Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. **Meat Science** v.61, p.397-404, 2002.

MUGUERZA, E.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Improvement of nutritional properties of Chorizo of Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. **Meat Science**, v.64, n.4, p.1361-1367, 2003.

MUNOA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, 1988.

MUTHUKUMARASAMY, P.; HOLLEY, R.A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.24, p.82-88, 2007.

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, p.120-127, 2008.

NUBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

ORDÓÑEZ, J.A.P.; RODRIGUEZ, M.I.C.; ALVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALEZ, L.H. **Tecnología de Alimentos: alimentos de Origen Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.279,

OSPINA-E, J.C.; CRUZ, S.A.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. Development of combinations of chemically modified vegetable oils as pork backfat substitutes in sausages formulation. **Meat Science**, v.84, n.3, p.491-497, 2010.

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.

PAYNE, S.; GIBSON, G.; WYNNE, A.; HUDSPITH, B.; BROSTOFF, J.; TUOHY, K. In vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.4, p.1-8, 2003.

PEREZ-ALVAREZ, J. A.; SAYES-BARBARE, M. E.; FERNANDEZ-LOPEZ, J.; ARANDA-CATALA, V. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. **Food Research International**, v. 32, n. 9, p. 599-607, 1999.

PEREIRA, D. I. A.; GIBSON, G. R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4689-4693, 2002. p. 242-248, 2006.

PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, n.4, p.259-281, 2002.

PIRCHER, A.; FRIEDRICH, B.; PAULSEN, P. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. **European Food and Research Technology**, v.226, p.225–231, 2007.

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

PIERSON, M.; SMOOTH, L. Nitrite, nitrite alternatives and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.17, p.141-187, 1987.

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

POSSEMIERS, S.; VERTHÉ, K.; UYTENDAELE, S.; VERSTRAETE, W. PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v.49, n.3, p.495–507, 2004.

PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos**. 2ed. Zaragoza: Acribia, 1994.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa: Editora UFV, 2007. p.599.

ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.3-16, 2002

ROSSI, E.A. **Alimentos funcionais**. In: DAMASO, A. Nutrição e exercícios na prevenção de doenças. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.337-362.

ROSSI, E.A.; GIORI, G.S.; HOLGADO, A.P.R.; VALDEZ, G.F. In vitro effect of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* on cholesterol. **Microbiologie-aliments-nutrition**, v.12, p. 267-270, 1994.

ROSSI, E.A., VENDRAMINI, R.C., CARLOS, I.Z., UEIJI, I.S., SQUINZARI, M.M., SILVA JÚNIOR, S.I., VALDEZ, G.F. Effects of a novel fermented soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.74, p. 213-216, 2000.

ROSSI, E.A., VENDRAMINI, R.C., CARLOS, I.Z., OLIVEIRA, M.G., VALDEZ, G.F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.53, n.1, 2003.

ROSSI, E.A., CAVALLINI, D.C.U., CARLOS, I.Z., VENDRAMINI, R.C., DÂMASO, A.R., VALDEZ, G.F. Intake of isoflavone-supplemented soy yogurt fermented with *Enterococcus faecium* lowers serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of hypercholesterolemic rats. **European Food and Research Technology**, v.228, p.275-282, 2008.

RUBIO, R., AYMERICH, T., BOVER-CID, S., GUÀRDIA, M.D., ARNAU, J., GARRIGA, M. Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299 V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, 51–56, 2013a.

RUBIO, R., MARTÍN, B., AYMERICH, T., GARRIGA, M. The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.186, p.55–60, 2014.

RUST, R. E. **Productos embutidos**. In: PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B.S. (Org). Ciencia de La Carne y de Productos Carnicos. 2nd ed. Zaragoza: Acribia, 1994. p.415-440.

RUUSUNEN, M.; PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**, Barking, v.70, n.3, p.531-541, 2005.

SAARELA, M., et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.

SAAVEDRA, L., TARANTO, M.P., SESMA, F., DE VALDEZ, G.F. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p.241-245, 2003.

SAGRATINI, G., MAGGI, F., CAPRIOLI, G., CRISTALLI, G., RICCIUTELLI, M., TORREGIANI, E, VITTORI, S. Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marche and Abruzzo regions of Italy using HSPME–GC–MS and HPLC–MS. **Food Chemistry**, v.132, n.3, p.1592-1599, 2012.

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

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.8, p.341- 347, 1998.

SARASIBAR, B., SÁNCHEZ, J. M., BELLO, J. Influencia de nitratos y nitritos sobre la estabilidad del pimenton (*Capsicum annum* L.) y el desarrollo del color en el chorizo de pamlona. **Alimentaria**, v.19, 19-23, 1989.

SEBRANEK, J. G.; FOX JR., J. B. A review of nitrite and chloride chemistry: interactions and implications for cured meats. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 36, p. 1169-1182, 1985.

SEVERINI, C.; DE PILLI, T.; BAIANO, A. Partial substitution of porkbackfat with extra-virgin olive oil in “salami” products: effects on chemical, physical and sensorial quality. **Meat Science**, v.64, p. 323-331, 2003.

SHAHIDI, F.; PEGG, R. B.; SEN, N. P. Absence of volatile N-nitrosamines in cooked nitrite-free cured muscle foods. **Meat Science**, v.37, p.327-336, 1994.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines of food safety and human health. **Food Research International**, v.29, p.675-690, 1996.

SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.213-231, 1996.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p.317.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVA C, LIMA AP, CASTILHOS F, CARDOZO FILHO L, OLIVEIRA JV. Non-catalytic production of fatty acid esters from soybean oil with supercritical ethanol in a two-step process using a microtube reactor. **Biomass & Bioenergy**, v.35, p.526-532, 2011.

SIQUEIRA, S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: Embrapa 1995. p.159.

SIVIERI, K.; BIANCHI, F; ROSSI, E.A. Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183. **Functional Foods in Health and Disease**, v.10, n.1, p.389-402, 2011.

SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A.L.T.; BARBISAN, L.F; BEDANI, R; PAULY, N.D; CARLOS, I.Z; BENZATTI, F; GOMES, E.; ROSSI, E.A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male rats. **European Food Research and Technology**, v. 228, p. 231-237, 2008.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R. (Ed) Handbook of fermented functional foods. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.27-58.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 2ed. London: Academic , 1993. p.338.

STROMPFOVÁ, V., MARCINÁKOVÁ₂ M., SIMONOVÁ₂ M., GANCARCÍKOVÁ₂ S., JONECOVÁ₂ Z., SCIRANKOVÁ₂ L., KOSCOVÁ₂ J., BULECA₂ V., COBANOVÁ₂ K., LAUKOVÁ₂ A. *Enterococcus faecium* EK13—an enterocin A-producing strain with probiotic character and its effect in piglets. **Anaerobe**, v. 12, p. 242-248, 2006.

SUZZI, G., GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.41–54, 2003.

TALON, R.; LEROY, S.. LEBERT, I. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starter. **Meat Science**, v.77, p.55-62, 2007.

TAN, S.S., AMINAH, A., ZHANG, X.G; ABDUL, A.B.Optimizing plam oil and palm stearin utilization for sensory and textural properties of chicken frankfurters, **Meat Science**, v.73, n.3, p.387-397, 2006.

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

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Unisinos, 2003.

TERRA, N.N. **Fermentação cárnea: princípios e inovações**. Atualidades em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. São Paulo: Varela, 2006. p.29-36.

TERRA, N.N. **Particularidades na Fabricação de Salames**. Atualidades em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. São Paulo: Varela, 2006. p.37-45.

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

THARMARAJ, N.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2288-2296, 2003.

THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nissin. In: NAIDU, A.S.; (Eds). *Natural Food Antimicrobial Systems*. California: CRC Press, 2000. p.463-524.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v.81, n.3, p.1031-1064, 2001.

TZORTZIS, G.; GOULAS, A. K.; GEE, G. M.; GIBSON, G. R. A novel galactooligosaccharide mixture increases the bifidobacterial population numbers in a continuous in vitro fermentation system and in the proximal colonic contents of pigs in vivo. **Journal of Nutrition**, v.135, n.7, p. 1726-1731, 2005.

- TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.233-244, 2003.
- VALENCIA, I.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Stability of linseed oil and antioxidants containing dry fermented sausages: a study of the lipid fraction during different storage conditions. **Meat Science**, v.73, n.1, p.269-277, 2006.
- VAN DE WIELE, T.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H.; VERSTRAETE. Prebiotic effect of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v.51, n.1, p.143-153, 2004.
- VAN DE WIELE, T.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H.; VERSTRAETE, W. Inulintype fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.2, p.452–460, 2007.
- VANDENDRIESSCHE, F. Meat products in the past, today and in the future. **Meat Science**, Barking, v.78, n.1-2, p.104-113, 2008.
- VERLUYTEN, J.; MESSENS, W.; DE VUYST, L.D. The curing agent sodium nitrite, used in the production of fermented sausages, is less inhibiting to the bacteriocin-producing meat starter culture *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 under anaerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.3833-3839, 2003.
- VISSANGUAN, W.; BENJAKUL, S.; RIEBROY, S.; THEPKASIKUL, P. Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics. **Food Chemistry**, v.66, pp. 579–588, 2004.
- VURAL, H.; JAVIDIPOUR, I. Replacement of beef fat in frankfurters by interesterified palm, cottonseed and olive oils. **European Food Research and Technology**, v.214, p. 465–468, 2002.
- VURAL, H.; JAVIDIPOUR, I.; OZBAS, O.O. Effects of interesterified vegetable oils and sugarbeet fiber on the quality of frankfurters. **Meat Science**, v.67, p.65-72, 2004.

- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases: the need to act. 2003a. Disponível em: www.who.int/whr/2003/chapter6/en/index1html . Acesso em: 03 de mar 2010.
- WONG, J.W.; DE SOUZA, R.; KENDALL, C.W.C.; EMAM, A.; JENKINS, D.J.A. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, n.3, p. 235-243, 2006
- YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**. v. 72, n.3, p. 317-32, 1983.
- YOUSSEF, M.K.; BARBUT, S. Effects of protein level and fat/oil on emulsion stability, texture, microstructure and color of meat batters. **Meat Science**, v.82, p.228-233, 2009.
- YUNES, J.F.F. **Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela**. 2010. 103f. (Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; BADIANI, A.; CHIZZOLINI, R. Lipid and colour stability of Milano type sausages: effect of packing conditions. **Meat Science**, Oxford, v.61, n.1, p. 7-14, 2002.
- ZERT, P. Saucisson sec: matière première, ingrédients et additifs. In Encyclopedie de la charcuterie. Sousana, Paris, p.280-281,1980.
- ZHAO, J.R.; YANG, H. Progress in the effect of probiotics on cholesterol and its mechanism. **Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao.**, v. 45, n.2, p. 315-319, 2005.

Anexo 1. Modelo de ficha para escala hedônica estruturada mista de nove pontos.

Nome: _____ Data: _____

Prove a amostra e indique sua opinião em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, utilizando a escala abaixo:

09 gostei muitíssimo	Amostra: _____
08 gostei muito	Aparência: _____
7 gostei moderadamente	Cor: _____
6 gostei ligeiramente	Aroma: _____
5 nem gostei/nem desgostei	Sabor: _____
4 desgostei ligeiramente	Impressão global: _____
3 desgostei moderadamente	
2 desgostei muito	
1 desgostei extremamente	

Anexo 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Teste de aceitação

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____,
Idade _____ anos, Residente na _____,
nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estudar o efeito da utilização de bactérias lácticas com capacidade de redução de colesterol, nas características tecnológicas, sensoriais e de segurança de um embutido cárneo fermentado, similar ao salame, com teores de gordura, nitrito e nitrato reduzidos;
2. Ao participar desse trabalho contribuirei para o desenvolvimento de um produto cárneo fermentado, similar ao salame, que pode resultar em benefícios à saúde do consumidor;
3. Como voluntário deste estudo, terei que participar do teste de aceitação do salame potencialmente probiótico e informar o quanto gostei ou desgostei do produto, utilizando uma ficha apropriada. **Para a realização da análise sensorial não será necessária a ingestão do produto.**
4. Os riscos ou desconfortos aos quais estarei submetido ao participar dessa pesquisa serão mínimos e, as reações alérgicas ou desconfortos são pouco prováveis.
5. Todas as vezes que houver necessidade de retorno, voltarei ao laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição (FCF – Araraquara). Não terei despesas ao participar do estudo, uma vez que o mesmo será realizado nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, e por isso, não haverá a necessidade de ressarcimento por parte da equipe responsável ou pela Instituição (FCF/UNESP);
6. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
7. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo ou penalização;
8. Para qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica (Mariana Nougalli Roselino, tel: 3301 6932);
9. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntário (a), do estudo “Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas”.

Araraquara, _____ de _____ de 2013.

Assinatura do Voluntário: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Anexo 3. Modelo de ficha de intenção de compra.

Nome: _____ Data: _____

Assinale abaixo a sua intenção de compra:

Amostra: _____

() Eu certamente compraria o produto

() Eu provavelmente compraria o produto

() Tenho dúvidas se compraria o produto

() Eu provavelmente não compraria o produto

() Eu certamente não compraria o produto

Comentários: _____

Anexo 4. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - ADQ

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente na _____, nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estudar o efeito da utilização de bactérias lácticas com capacidade de redução de colesterol, nas características tecnológicas, sensoriais e de segurança de um embutido cárneo fermentado, similar ao salame, com teores de gordura, nitrito e nitrato reduzidos;
2. Ao participar desse trabalho contribuirei para o desenvolvimento de um produto cárneo fermentado, similar ao salame, que pode resultar em benefícios à saúde do consumidor;
3. Como voluntário deste estudo, terei que participar de um teste sensorial cujo objetivo é identificar e medir as principais características do produto (salame probiótico). Para a realização da análise sensorial não será necessária a ingestão do produto.
4. Precisaré comparecer ao laboratório de análise sensorial da FCF para a realização da Análise Descritiva Quantitativa do produto;
5. A minha participação como voluntário terá a duração de, aproximadamente, 4 meses (com 2 sessões por semana, sendo cada sessão com duração de 30 minutos);
6. Os riscos ou desconfortos aos quais estarei submetido ao participar dessa pesquisa serão mínimos e, as reações alérgicas ou desconfortos são pouco prováveis.
7. Todas as vezes que houver necessidade de retorno, voltarei ao laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição (FCF – Araraquara). Não terei despesas ao participar do estudo, uma vez que o mesmo será realizado nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e por isso, não haverá a necessidade de ressarcimento por parte da equipe responsável ou pela Instituição (FCF/UNESP);
8. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
9. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo ou penalização;
10. Para qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica (Mariana Nougalli Roselino, tel: 3301 6932);
11. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntária (o), do estudo "Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas".

Araraquara, ____ de ____ 2014.

Assinatura do Voluntário: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Mariana Nougalli Roselino

Anexo 5. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – SEMH

Eu _____, RG _____, Estado Civil _____, Idade _____ anos, Residente na _____, nº _____, Bairro _____, Cidade _____, Telefone _____.

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade estudar o efeito da utilização de bactérias lácticas com capacidade de redução de colesterol, nas características tecnológicas, sensoriais e de segurança de um embutido cárneo fermentado, similar ao salame, com teores de gordura, nitrito e nitrato reduzidos;
2. Ao participar desse trabalho contribuirei para o desenvolvimento de um produto cárneo fermentado, similar ao salame, que pode resultar em benefícios à saúde do consumidor;
3. Os riscos ou desconfortos aos quais estarei submetido ao participar dessa pesquisa serão mínimos e, as reações alérgicas ou desconfortos são pouco prováveis.
4. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;
5. Estou ciente de que o material a ser doado (amostra de fezes) será utilizado exclusivamente nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
6. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo ou penalização;
7. Para qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica (Mariana Nougalli Roselino, tel: 3301 6932);
8. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntário (a), do estudo “Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas”.

Araraquara, _____ de _____ de 2013.

Assinatura do Voluntário: _____

Assinatura do Pesquisador: _____

Mariana Nougalli Roselino

Anexos 6 e 7. Galeria do sistema API 20-Strep e API 60 CH utilizado para a identificação das espécies de *Enterococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. presentes nas diferentes formulações de salames probióticos.



Anexo 8. Modelo de ficha utilizado no levantamento dos termos descritores.

Nome: _____

Data: _____

Por favor, avalie as duas amostras quanto à aparência, aroma, sabor e textura, indicando em que elas são similares e em que são diferentes.

Amostras: _____ e _____

Aparência

Textura

Sabor

Aroma

Anexo 9. Modelo de ficha utilizado na análise das amostras na ADQ.

Nome: _____ Data: ____/____/____ Amostra: _____

Por favor, faça um traço vertical na escala no ponto que melhor descreve a intensidade de cada atributo da amostra de salame.

Aparência:

1) Cor vermelha	_____	_____
	fraca	forte
2) Quantidade de gordura	_____	_____
	pouca	muita
3) Uniformidade de gordura	_____	_____
	pouca	muita
4) Regularidade da borda	_____	_____
	pouco	muito
5) Brilho	_____	_____
	pouco	muito

Aroma:

1) Condimentado	_____	_____
	fraco	forte
2) De carne	_____	_____
	fraco	forte
3) Oxidado	_____	_____
	fraco	forte

Textura:

1) Maciez	_____	_____
	pouco	muito
2) Suculento	_____	_____
	pouco	muito

Sabor:

1) Salgado	_____	_____
	pouco	muito
2) Condimentado	_____	_____
	fraco	forte
3) Ácido	_____	_____
	pouco	muito
4) Ranço	_____	_____
	fraco	forte
5) Defumado	_____	_____
	fraco	forte
6) Picante	_____	_____
	fraco	forte

Artigo submetido

Journal of Food Science

Safety of a low-fat fermented sausage produced with
Enterococcus faecium CRL 183 and *Lactobacillus*
acidophilus CRL1014 probiotic strains



**Safety of a low-fat fermented sausage produced with
Enterococcus faecium CRL 183 and Lactobacillus acidophilus
CRL1014 probiotic strains**

Journal:	<i>Journal of Food Science</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	6 JFS: Food Microbiology and Safety
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Roselino, Mariana; Faculty of Pharmaceutical Science, UNESP, Food and Nutrition de Almeida, Jéssica Canaan, Josiane Pinto, Roseli Ract, Juliana; Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Department of Biochemical Pharmaceutical Technology de Valdez, Graciela; Reference Center for Lactobacilos (CERELA) Rossi, Elizeu; Faculty of Pharmaceutical Science, UNESP, Food and Nutrition Cavallini, Daniela; Faculty of Pharmaceutical Science, UNESP, Food and Nutrition
Keywords:	bacteriocins, microbiological safety, olive oil, sodium nitrite, meat products

SCHOLARONE™
Manuscripts

December, 29 of 2015.

Editor-in-Chief: E. Allen Foegeding - **Journal of Food Science**

In this manuscript, original article, (“**Safety of a low-fat fermented sausage produced with *Enterococcus faecium* CRL 183 and *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 probiotic strains**”), our research group demonstrated the possibility to obtain a potentially probiotic fermented meat product using cultures with hypolipidemic properties. The results obtained are important for functional food area, since the potential probiotic product could represent, after some further studies, a valid and safe alternative in the consumption of sausages.

I declare that the manuscript represents an original research, which is not currently being considered by another journal, and that if accepted by this journal (Journal of Food Science), it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the Editor-in-chief. I confirm also that all authors listed have contributed to the work and approved the contents of the submitted manuscript and declare that there are no conflicts of interests.

I as corresponding author, I agree to review for at least three manuscripts submitted to Journal of Food Science.

Best regards,

Mariana Nougalli Roselino

E-mail address: mari_roselino@yahoo.com.br

Telephone: 55 (016) 3301-6932

Fax: 55 (016) 3301-6920

**Safety of a low-fat fermented sausage produced with *Enterococcus faecium* CRL
183 and *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 probiotic strains**

Mariana Nougalli Roselino^a, Jéssica Ferraz de Almeida^a, Josiane Márcia Maria Canaan^a,
Roseli Aparecida Pinto^a, Juliana Neves Rodrigues Ract^b, Graciela Font de Valdez^c,
Elizeu Antonio Rossi^a, Daniela Cardoso Umbelino Cavallini^a.

^aDepartment of Food and Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo
State University, Araraquara, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Biochemical Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, University of Sao Paulo

^cReference Center for Lactobacilos (CERELA), San Miguel de Tucumán
(Argentina)

Address correspondence to: Mariana Nougalli Roselino, Sao Paulo State
University, Department of
Food and Nutrition, Rodovia Araraquara/Jau Km 1, 14801-902, Araraquara, Sao Paulo,
Brazil, e-mail: mari_roselino@yahoo.com.br

Word count of text: 6014

Short version of title: Safety of a low-fat fermented sausage...

Choice of journal/section: Food Microbiology and Safety

35 **Abstract**

36 The use of probiotics in meat products has aroused interest, such as their addition in to
 37 fermented sausages that are usually consumed in their raw form and without heating.
 38 This work is aimed at studying the effect of using lactic acid bacteria with lipid-lowering
 39 properties (*Enterococcus faecium* CRL183 and *Lactobacillus acidophilus* CRL1014) on the
 40 physicochemical characteristics and safety of fermented sausages with fat and curing salt
 41 reduction. The probiotic cultures were submitted to preliminary tests for evaluating their
 42 resistance to curing salts and their capacity producing antimicrobial substances. The
 43 sausages quality was evaluated by physicochemical and microbiological analyses at the
 44 beginning of the processing and during the ripening and storage periods. The *E. faecium*
 45 CRL 183 strain exhibited no log reduction in the population of viable cells (10⁹ CFU mL)
 46 for all evaluated concentrations of sodium chloride and nitrite, while the *L. acidophilus*
 47 CRL 1014 strain showed a reduction of one log cycle in comparison with the control
 48 treatment (p <0.05), reaching a final population of viable cells in the order of 10⁸ CFU/mL.
 49 All treatments presented appropriate physicochemical and microbiological characteristics to
 50 the standards established for fermented sausage. The treatments F2-F7 (with fat reduction)
 51 showed an increase in oleic acid and decrease in saturated acid content, compared to control
 52 sausage. The results indicate that it is possible to obtain a potentially probiotic fermented
 53 meat product using cultures with hypolipidemic properties. The reduction in nitrite content
 54 and the replacement of traditional strains by probiotic ones did not compromise their
 55 microbiological safety and technological properties.

56

57 **Keywords:** bacteriocins, microbiological safety, olive oil, sodium nitrite, meat
 58 products.

59

60

61 Practical Application:

62 The replacement of traditional cultures for probiotic did not negatively alter the
63 physicochemical characteristics of the sausage.

64 Reducing the amount of nitrite and nitrate did not compromise the microbiological
65 safety.

66 The probiotic *E. faecium* CRL 183 proved to be more interesting from a technological
67 point of view.

68

69

70 Introduction

71 Currently, the food industry is faced with a dilemma: the search for safety foods
72 that are minimally processed and free of food additives at the same time. This market
73 trend has encouraged the use of alternative forms of food preservation.

74 Fermentation has been used as a preservation technique for millennia, and is
75 considered an effective way to increase the shelf life of food and beverages by a
76 combined action of antimicrobial metabolites produced during the process (Ross and
77 others 2002).

78 Microorganisms able to confer health benefits to humans, known as probiotics,
79 are traditionally added to dairy products, including yogurt, fermented milks and dairy
80 desserts. Total or partial replacement of traditional starter cultures for probiotic ones can
81 contribute to food product safety and offer sensory, technological and nutritional
82 advantages, representing an attractive alternative for the food industry
83 (Muthukumarasamy and Holley 2007; Pidcock and others 2002).

84 In the meat industry, the use of probiotics is more promising in fermented
85 products such as sausage, which are usually processed and consumed without heating
86 (Ammor and Mayo 2007; Työppönen and others 2003).

87 Therefore, selecting an appropriate probiotic is crucial to get the desired
88 beneficial effects. Considering the high prevalence of cardiovascular disease and the
89 importance of lipid parameters in the etiology of this pathology, many researchers have
90 been devoted to identifying strains with lipid-lowering potential. Rossi and others
91 (1994) studied 18 bacterial strains regarding their *in vitro* cholesterol removal ability,
92 and the best results were obtained with *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 and
93 *Enterococcus faecium* CRL183. Other studies indicate that the strain of *Enterococcus*
94 *faecium* CRL 183 is able to modulate the intestinal microbiota (Bedani 2008; Cavallini
95 and others 2011) and reduce the risk of developing colon (Sivieri and others 2008) and
96 breast cancer (Kinouchi 2006), and intensity of inflammatory bowel disease (Celiberto
97 2014). Nowadays, such strains and their beneficial properties were evaluated only in
98 soy-based products (Cavallini and others 2009; Rossi and others 2000, 2003, 2008).

99 The aim of the present work was to produce a fermented sausage with fat and
100 nitrite reduction using two probiotic bacteria (*Enterococcus faecium* CRL 183 and
101 *Lactobacillus acidophilus* CRL1014) with lipid-lowering properties in order to enhance
102 the safety and nutritional properties of the product.

103

104 **Materials and methods**

105 **Bacterial strains**

106 The *Enterococcus faecium* CRL183 and *Lactobacillus acidophilus* CRL1014
107 probiotic cultures were obtained from the Centro de Referencia para Lactobacilos –
108 CERELA (San Miguel de Tucumán, Argentina). The pathogenic cultures (*Listeria*

109 *monocytogenes* IAL 628, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* IAL
110 2431 and *Escherichia coli* IAL 339) used as indicators were obtained from the Adolfo
111 Lutz Institute – Sao Paulo, Brazil.

112

113 **Sensitivity of probiotic cultures to sodium chloride (NaCl) and sodium nitrite**

114 The probiotic cultures' resistance to NaCl (1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5% and 3.0%)
115 and sodium nitrite (80, 100, 120, 150 and 200 ppm) added to an MRS agar medium (*L.*
116 *acidophilus*) or M17 agar (*E. faecium*) were assessed. After the reactivation, 1 ml
117 probiotics culture (dilution 10^{-7}) was seeded in a specific medium that was
118 supplemented either with different concentrations of curing salts or not (control), and
119 then incubated at 37°C/48 hours. The results were expressed as colony-forming units
120 per milliliter (CFU/mL) and compared with those of the control treatment (Arihara and
121 Itoh 2000).

122

123 **Bacteriocin assay**

124 The production of bacteriocins by probiotic cultures (*E. faecium* CRL 183 and
125 *L. acidophilus* CRL1014) was studied by the spot-on-lawn technique, using *Listeria*
126 *monocytogenes* IAL 628, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *typhimurium* IAL
127 2431 and *Escherichia coli* IAL 339 as indicating microorganisms (Lewus and others
128 1991). The production of bacteriocins was indicated by the presence of inhibition halo
129 around the colony.

130

131 **Fermented sausage formulation and processing**

132 Three batches of fermented sausages were processed on different days. The
133 fermented sausages were obtained in seven treatments, according to the Italian salami

134 manufacturing procedure, and as proposed by Koutsopoulos and others 2008; Macedo
135 and others 2008; Severini and others 2003, with a few modifications.

136 F1 - traditional cultures without fat and curing salt reduction (0.015% nitrite and
137 0.005% nitrate); F2 - traditional cultures without curing salt reduction; F3 – traditional
138 cultures with curing salt reduction (0.007% nitrite and 0.003% nitrate); F4 and F5 -
139 probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salt reduction,
140 respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with
141 curing salt reduction, respectively. Treatments 2 to 7 were conducted using 8g/100 of
142 pork fat, corresponding to a reduction of 60% of pork fat content in comparison with
143 traditional formulations (T1: 20g/100g) (Terra 1998). In order to preserve the sensory
144 characteristics of the sausage, extra virgin olive oil that was pre-emulsified with sodium
145 caseinate (2g/100g) was used as a partial pork fat replacement. The fermented sausages
146 with curing salt reduction have been formulated to provide nitrite and nitrate
147 concentration that is 50% lower than that observed in traditional formulations.

148 The basic low-fat sausage mixture was prepared with the following ingredients
149 and additives: 61.5% pork meat, 28.5% cow meat, 8.0% pork fat, 2.0% olive oil, 2.5%
150 sodium chloride, 0.5% sodium ascorbate, 0.5% sucrose, 0.7% lactose, 0.05% garlic
151 powder, and 0.13% white pepper. Nitrite and nitrate were added at 0.015% and 0.05%
152 (without curing salt reduction) or 0.007% and 0.03% (with curing salt reduction). The
153 probiotic and commercial starter cultures were added in a sufficient amount to reach at
154 least 8 log CFU/g. The probiotic cultures were propagated in M17 broth (Himedia,
155 India) for 24 hours at 37°C (*Enterococcus faecium* CRL183) or an MRS medium (Man
156 Rogosa Sharpe, Accumedia, USA for 72h at 37°C (*Lactobacillus acidophilus*
157 CRL1014).

158 The meat raw material was ground in a 5 to 8 mm thick stainless disc, and then
159 mixed with the other ingredients in a meat mixer for 5 minutes. Frozen pork fat was
160 manually cut and added to the mixture. Afterwards, the starter probiotic and traditional
161 cultures were incorporated, and the meat mixture was embedded in cellulose sausage
162 casings that were 50 mm in diameter. Pieces of about 15cm in length were maintained
163 in fermentation (7 days) and ripening (23 days), totaling 30 days in chamber
164 (Koutsopoulos and others 2008; Macedo and others 2008). After the fermentation and
165 ripening period, the sausages were vacuum-packed and stored under refrigeration (4°C)
166 for a period of 90 days, totaling 120 days of study.

167

168 **Physicochemical analyses**

169 All Physicochemical analyses were carried out in triplicate for each batch at
170 different sampling times.

171

172 **pH and Water Activity measurement**

173 pH was measured in homogenate prepared by blending 20 g of sausage with
174 80 ml of distilled water for 30 s. Readings were taken with a pHmetro Qualxtron (model
175 8010) (Liaros and others 2009). The water activity was determined in previously
176 crushed samples using an AquaLab Water Activity Meter (model CX-2).

177 **Lipid oxidation determination**

178 The 2-thiobarbituric acid (TBA) test was used to determine the oxidative
179 rancidity extent (Koutsopoulos and others 2008). Readings were obtained on an
180 Ultrospec™ 1100 pro (Amersham Biosciences Limited) at 532 nm.

181

182 **Fatty acid profile determination**

183 The fatty acids (FA) quantification was preceded by the extraction of the lipid
184 fraction (Folch 1957), and the fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained
185 according to Hartman and Lago (1973) adapted to microscale (Menezes and others
186 2013). Analyses of FAMES were carried out on a Varian GC gas chromatograph (model
187 430 GC, Varian Chromatograph Systems, Walnut Creek, CA, USA), equipped with a
188 CP 8412 auto injector. The Galaxie software was used for the quantification and
189 identification of peaks. The injections were performed on a 100-m fused silica capillary
190 column (ID = 0.25 mm), coated with 0.2 micrometers of polyethylene glycol (SP-2560,
191 Supelco, USA), using helium as the carrier gas at an isobaric pressure of 37 psi, linear
192 velocity of 20 cm/s, make-up gas: helium at 29 mL/min, split ratio of 1:50, volume
193 injected: 1.0 microL. The injector temperature was set at 250 °C and the detector
194 temperature at 280 °C. The oven temperature was initially held at 140 °C for 5 min, set
195 to increase to 240 °C at a rate of 4 °C/min, and then held isothermally for 30 min. The
196 qualitative FA composition of the samples was determined by comparing the retention
197 times of the peaks produced after injecting the methylated samples with those of the
198 respective standards of FA. The quantitative composition was obtained by area
199 normalization and expressed as mass percentage, according to the AOCS Official
200 Method Ce 1-62. All samples were analyzed in duplicate and the reported values are the
201 average of the two runs (Silva and others 2011).

202

203 **Microbiological analysis**

204 Microbiological analyses were performed at baseline, at the end of fermentation
205 and ripening steps, and at intervals of 30 days during the storage time, totalizing 120
206 days. For each period of analysis, 25 g of sausage (without casing) was removed under

207 aseptic conditions and homogenized for 30min with 225 mL peptone water using a
208 Stomacher (Nova Etica, Ethik Techonlogy, Brazil). The homogenate was serially
209 diluted and used to determine microbiological safety and viable cell population.

210

211 **Microbiological safety**

212 The microbiological quality of fermented sausages was evaluated by studying:
213 *Staphylococcus aureus* - enumeration on Baird Parker agar (Accumedia, USA), at
214 37°C/48h and confirmation by the coagulase test (Silva and others 2001); total
215 coliforms and *E.coli* (CFU/g) - cultured on Petrifilm™ *E.coli*/Coliform count plate
216 method at 37°C/48h 48h (Silva and others 2001); *Salmonella* spp. (CFU/g) - pre-
217 enrichment in buffered peptone water (BPW); selective enrichment in Tetrathionate
218 broth (TT - Accumedia, USA) and Rappaport Vassiliadis broth (RV - Accumedia,
219 USA); detection in Hektoen enteric agar (HE - Accumedia, USA) and agar Xylose
220 Lysine Desoxycholate (XLD - Accumedia, USA) (Downes and Ito 2002). *Listeria*
221 *monocytogenes* and *Clostridium botulinum* were analyzed at the Science Center and
222 Quality Food (SCQF) in the Food Technology Institute, Campinas - SP. Three
223 replicates were carried out for each microorganism group/ specie.

224

225 **Viable cell counts**

226 The population of microorganisms of the genus *Enterococcus* spp. was
227 performed by plating on a KF *Streptococcus* agar selective medium (37°C/48h,
228 Himedia, India) with confirmation in agar bile esculin azide (Accumedia, USA) for all
229 colonies with different morphologies. *Lactobacillus* spp. was enumerated using MRS
230 agar (37°C/72h, anaerobic, Accumedia, USA).

231

232 **Statistical analysis**

233 The quantitative results were reported as mean $\pm$ SEM. The results were tested
234 by the one-way analysis of variance (ANOVA), and individual means were compared
235 by Tukey's post test ($p < 0.05$). All analyses were carried out using the statistical
236 software Bioestat 5.0.

237

238 **Results and discussion**

239

240 **Resistance to NaCl and curing salts**

241 The use of starter cultures that are resistant to curing salts is fundamental to
242 obtaining fermented probiotics sausages, since the addition of NaCl and nitrite are
243 necessary to ensure the microbiological safety of the product (Papamanoli and others
244 2003).

245 The sensitivity to curing salts analysis revealed that *Enterococcus faecium*
246 CRL183 kept the population of viable cells at a range of 9 log CFU/mL for all evaluated
247 NaCl and nitrite concentrations with no difference from the control treatment ($p < 0.05$)
248 (Table 1). The total *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 viable cells population was
249 reduced in the presence of different NaCl and nitrite concentrations, differing from the
250 control treatment ($p < 0.05$). The reduction in the population of *Lactobacillus acidophilus*
251 CRL 1014 was similar for all NaCl concentrations ($- 1.3$ log CFU/g), while the greatest
252 curing salt reduction was observed with the addition of sodium nitrite 200 ppm ($- 0.5$
253 log CFU/g).

254 The ability to resist to the curing salts is a strain-specific effect. The work
255 conducted by Sameshima and others (1998) concluded that among the 202
256 *Lactobacillus* species evaluated, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *L. rhamnosus* and *L.*

257 *acidophilus* were resistant to curing salts. Macedo (2005) evaluated the *Lactobacillus*
258 *casei* (LC 01), *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (ATCC 10746/CCT 0566) and
259 *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* (ATCC 7469/6645 CCT) strains resistance to curing
260 salts. The results showed that all strains are resistant to the tested concentrations of
261 NaCl (1% to 3%) and nitrite (80 ppm to 200 ppm), with no reduction in microbial
262 population in comparison with the control treatment.

263 Despite the reduction observed in its viability, the probiotic bacteria evaluated in
264 the present study can be used as starter cultures in fermented meat products because the
265 viable cell population exceeds the minimum recommended requisite for beneficial
266 effects attributed to probiotics (8 log CFU/ ingested daily portion) (Hill and others
267 2014).

268

269 Table 1.

270

271 **Bacteriocin production**

272 Probiotic cultures (*Enterococcus faecium* CRL183 and *Lactobacillus acidophilus*
273 CRL1014) do not produce antimicrobial substances, specifically against the
274 microorganisms strains used as indicators (*Listeria monocytogenes* IAL 628, *Salmonella*
275 *enterica* ssp. *enterica* serovar *typhimurium* IAL 2431, and *Escherichia coli* IAL 339)
276 because it was not detected an inhibition halo in the spot-on-lawn test. As the initial test
277 was negative for the production of antimicrobial substances, it was not necessary the
278 continuation of the bacteriocins production confirmation analysis (sensitivity to protease
279 and bacteriophages lytic action).

280 The conditions used in this test (medium free of sucrose or other fermentable
281 sugar - TSAYE - and incubating anaerobically) enabled the exclusion of inhibiting

282 pathogens due to the presence of organic acids and hydrogen peroxide (Lewus and others
283 1991). Thus, the probiotic cultures could exert the desired protective effect by the
284 production of organic acids and/or hydrogen peroxide, or even through the production of
285 bacteriocins against other genera/species of microorganisms which were not evaluated in
286 this study.

287

288 **Physicochemical analyses**

289 **pH and Water activity measurements**

290 Table 2 presents the results of pH and water activity during the different stages
291 of the present study.

292 The sausage's final pH can vary from 5.5 to 4.6, depending on the acidification
293 rate of the starter cultures and the presence of yeast, as *Derbaryomyces hansenii*, which
294 is capable to raise the product's pH (Ammor and Mayo 2007).

295 In this study, the pH of sausages ready for consumption (T30) ranged from 4.98
296 to 5.26, however, no statistical difference between the treatments was observed at the
297 end of the fermentation (T7) and ripening (T30) periods, indicating that the use of
298 probiotics did not affect the fermentation process. When comparing the pH values at the
299 end of storage time (T120) with those at the end of the fermentation period (T7),
300 treatments F2 and F7 had the lowest and highest means, respectively. An eventual pH
301 increase can be attributed to basic compounds derived from protein degradation,
302 buffering substances and the decrease of electrolyte (Fernandez and others 1997;
303 Fonseca 1999).

304 Water activity represents the amount of available water for chemical and
305 enzymatic reactions, development of microorganisms and toxin production (Jay 1994).
306 In this way, the reduction of water activity inhibits the proliferation of spoilage and

307 pathogenic microorganisms (Siqueira 1995). According to the Brazilian legislation
308 (MAPA 2000), sausages ready for consumption should present a maximum water
309 activity of 0.92. By the end of the ripening period, all treatments with the exception of
310 F2 and F7 exhibited water activity values lower than 0.92, being in accordance with
311 current legislation. The decrease in this parameter remained during the storage period,
312 and after 30 days of storage at refrigeration temperature (T60), all treatments were in
313 compliance with the legislation requirements.

314
315 Table 2.

316 317 ***Lipid oxidation determination***

318 The lipid oxidation results are shown in Table 3.

319 The malondialdehyde (MDA) is the major secondary by-product of
320 lipid oxidation that reacts with 2-thiobarbituric acid (TBA). However, other compounds
321 present in the product, such as proteins and nitrite, can also react with TBA, thus
322 interfering with the obtained results (Silva and others 1999).

323
324 Table 3.

325
326 Some strains of lactic acid bacteria are able to inhibit the oxidation of lipids,
327 although the mechanism involved in this effect is still unknown (Inoue and others
328 1998). The results demonstrated that fermented sausages with *Enterococcus faecium*
329 CRL 183 showed the lowest oxidation means at the end of storage time (T120),
330 indicating that the probiotic can have a protective effect on the formation of undesirable
331 compounds in the product. The results were most evident for the treatment with nitrite

332 reduction (T5), suggesting that this additive concentration could also affect the obtained
333 results.

334 It is observed that, from T90, there was a reduction in the lipid oxidation rate in
335 all treatments, except for treatment F1, and it is supposed that the pH and water activity
336 (A_w) are responsible for it, which are making the system inappropriate for oxidation
337 increase (Karel and Young 1981). Additionally, this decrease can be attributed to the
338 reaction by malonaldehyde with proteins during the storage period, although
339 malonaldehyde is a secondary by-product of the oxidation of polyunsaturated FA
340 (Melton 1993 cited by Marangoni 2007).

341

342 **FA profile determination**

343 Table 4 reports the fatty acid composition of the lipid fractions extracted from
344 the sausages obtained by the different treatments in different processing steps. The
345 compositions were normalized by only taking into account the identified FA. In the case
346 of traditional formulation (F1), most of the lipid fraction is provided by the pork fat
347 added as an ingredient to the formulation, besides the low levels that are naturally
348 present in pork meat and beef. The main FA found in this formulation at T0 were oleic
349 (48.0%), palmitic (25.9%), and linoleic acids (8.3%), in addition to myristic, palmitoleic
350 and alpha-linolenic acids, which together represent less than 5.0% of total FA.
351 According to the Codex Alimentarius (CODEX, 2009) and the composition presented
352 by Gunstone and Harwood (2007), pork fat should contain 35-55% oleic acid, 20-30%
353 palmitic acid, 4-12% linoleic acid and up to 8% of myristic, palmitoleic and alpha-
354 linolenic acids together. Thus, the fatty acid composition of F1 at T0 is agreement with
355 that found in literature.

356 During the production stages, F1 presented some significant changes in fatty
357 acid profile, however being unimportant. Generally speaking, at the end of the storage
358 period (T120), the saturated fatty acid content increased from 40.4% to 42.2% in
359 detriment of the unsaturated fatty acid content, which decreased from 59.6% to 57.8%.
360 This slight modification can be related to more severe oxidative processes in F1 if
361 compared to other formulations, as presented in Table 4, given that the chain reactions
362 of oxidative rancidity occur preferentially in unsaturated FA (Dransfield 2008).

363 The formulations F2 - F7 provided a 60% reduction in animal fat content if
364 compared to F1 (control formulation), and part of this reduction was due to the reduced
365 amount of fat added to the formulation, and partly by the partial replacement of pork fat
366 for olive oil. The Codex Alimentarius (CODEX, 1999) stipulates that olive oil should
367 contain levels of 55 to 83% oleic acid, its most abundant fatty acid, followed by linoleic
368 (3.5 to 21%) and palmitic acids (7.5 to 20%). The pork fat and olive oil have, therefore,
369 the same principal FA, but in different proportions. The addition of olive oil to the
370 formulations resulted in a significant increase in oleic acid content in most cases,
371 especially after 120 days of production, reaching an increase of 44.3 % in F1 and 50.4%
372 in F6. A decrease in the saturated fatty acid content was also observed, which is
373 interesting from a nutritional point of view, since myristic and palmitic acids are the
374 main hypercholesterolemic FA (Hayes and others 2001). Murguesa and others (2003)
375 also verified that a 25% reduction in fat content resulted in changes in the fatty acid
376 profile, which was revealed by an increase in the unsaturated FA (15.22 to 23.96%) and
377 a reduction in the saturated FA (37.83 to 32.81%).

378

379 Table 4.

380

381 Formulations F2 and F3 were produced using the same traditional cultures and,
382 in addition, F3 had a 50% reduction in the amount of added curing salts. Similarly, F4
383 and F5 were produced with the addition of the probiotic *E. faecium* CRL 183 strain,
384 with and without curing salt reduction, respectively. Comparably, F7 and F6 used the
385 probiotic *L. acidophilus* CRL 1014 strain, with and without curing salt reduction,
386 respectively. By comparing the levels of saturated FA of these formulations,
387 considering that each pair was added with the same microorganism (F2/F3, F4/F5, and
388 F6/F7), significant differences can be noted as a function of time or formulation, but
389 that does not indicate a possible influence of curing salt levels on the sausages. These
390 observations can indicate that the curing salt reduction did not result in significant
391 changes in the fatty acid composition of the product, which could emphasize the
392 advantageous aspect of this reduction on nutritional perspectives. It is important to
393 mention, however, that other results are needed to confirm this hypothesis.

394

395 **Viable cells cont**

396 According to the National Health Surveillance Agency's (ANVISA)
397 recommendations, probiotic microorganisms must be present in the range of 8.0 to 9.0
398 log CFU for a daily intake of the product. This recommendation is in agreement with
399 international guidelines for probiotics foods (Hills and others 2014).

400 For treatments F4 and F5, the population of *Enterococcus faecium* CRL183
401 (*Enterococcus* spp.) exhibited an increase of two and one logarithmic cycle,
402 respectively, at the end of the ripening period (T30: 8.54 ± 0.50 and 7.98 ± 0.08 log
403 CFU/g) (Table 5). In the storage phase, regardless of which treatment, there was a
404 reduction in the microorganism's population (T120 = F4: 7.15 ± 0.03 log CFU/g and F5:
405 7.18 ± 0.27 log CFU/g). The culture *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 (*Lactobacillus*

spp.) showed an increase of two logarithmic cycles in the population of viable cells at the end of the ripening period (T30) for treatment F6 ($8.52 \pm 0.36 \log \text{UFC/g}$), and of one cycle for F7 ($8.45 \pm 0.19 \log \text{CFU/g}$). After 90 days of storage (T120), both treatments exhibited a reduction in the population of *Lactobacillus* spp. It should be noted that the probiotic population showed no difference in all treatments after the fermentation period (T7).

Table 5.

The obtained results confirm those that had been achieved in the preliminary tests of curing salt resistance, thus indicating that the probiotic starter cultures are able to survive and multiply in the meat matrix. Despite the numerical reduction in the population of probiotic microorganisms, a daily intake to 10g of sausage (F4, F5, F6 and F7) would be enough to comply with ANVISA's and international guidelines recommendations and ensure its possible beneficial health effects.

Macedo and others (2008) tested three cultures of *Lactobacillus* spp. in combination with commercial starter cultures for producing probiotic salami. At the end of the ripening period (T25), the population of *L. paracasei*, *L. rhamnosus* and *L. casei* was $9.50 \cdot 10^7$, $5.50 \cdot 10^7$ and $3.45 \cdot 10^7 \text{CFU/g}$, respectively. Comam and others (2012) have found that the probiotic cultures *L. rhamnosus* IMC 501 and *L. paracasei* IMC 502 developed in Italian and Swiss salami, respectively, exhibiting a viable cell population of 10^8CFU/g at the end of the storage period. Similar results were published by Rubio and others (2013a), who have found that *L. rhamnosus* GG was able to dominate the natural microbiota of meat in fermented Spanish salami, reaching levels of 10^8CFU/g at

430 the end of ripening and storage periods. In another study, Rubio and others (2014)
431 evaluated six strains of *Lactobacillus* spp. (*L. casei* CTC1677, *L. casei* CTC1678, *L.*
432 *rhamnosus* CTC1679, *L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota) as starter
433 cultures in fermented salamis with sodium and fat reduction, and only *L. rhamnosus*
434 CTC1679 was able to multiply and reach levels of 10^8 UFC/g at the end of the ripening
435 period.

436 Table 6 shows the results for contaminants in meat sausage at different stages of
437 the study. There was a reduction in all microorganism groups studied throughout the
438 experimental period, and *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Clostridium*
439 *botulinum* were absent in all treatments from the beginning of the process (T0).
440 Fermentation was essential for reducing the population of microorganisms because, at
441 the end of this step (T7), all treatments exhibited a decrease in populations of coliforms
442 at 45°C/*E.coli*. After the ripening stage (T30), it was not detected the presence of
443 coliforms at 45°C/*E.coli* (Petrifilm™ *E.coli*/Coliform count plate by 3M - results
444 expressed as less than one CFU/g).

445 The population of coagulase-positive staphylococci was also reduced during the
446 storage period, and only treatments F3, F4 and F7 showed no significant difference in
447 analysis between the time periods. It should be noted that, among potentially probiotic
448 treatments, F5 exhibited the greatest reduction in this group of microorganisms at the
449 end of the 120 days of storage (1.58 log CFU/g).

450 The results obtained are in accordance with the Brazilian National Health
451 Surveillance Agency (ANVISA 2001), which requires a maximum of 5.10^3 CFU/g (3.7
452 log CFU/g) for coagulase-positive staphylococci, 10^3 CFU/g (3.0 log CFU/g) coliform
453 45°C and absence of *Salmonella* ssp. in 25 grams of fermented meat products.

454

455 Table 6.

456

457 **Conclusions**

458 The results clearly show that it was possible to obtain a potentially probiotic
459 fermented meat product with enhanced nutritional properties using bacteria that have
460 hypolipidemic properties as starter culture. The reduction in curing salt content and
461 replacement of traditional cultures by probiotic ones neither compromised the sausages'
462 microbiological safety, nor their physicochemical characteristics. Among the
463 treatments, F5 (fermented by *E. faecium* CRL 183, with fat and curing salt reduction)
464 was considered the most promising for presenting the greatest reduction in the
465 population of coagulase-positive staphylococci and lower lipid oxidation at the end of
466 the storage period. Future studies are needed to confirm the potential health effect of
467 this product.

468

469 **Acknowledgment**

470 This research was supported by FAPESP [Fundação de Amparo à Pesquisa do
471 Estado de São Paulo, Brazil].

472

473 **Author Contributions**

474 M.N.R.: have been involved in the design, data collection, drafting and revising
475 the manuscript critically for important intellectual content. J.F.A, J.M.M.C. and R.A.P.:
476 have been involved in the data collection and drafting the manuscript. J.N.R.R.: have
477 been involved in the fatty acid profile determination. G.F.V.: have been involved in
478 disponibilization of the probiotic strains. E.A.R. and D.C.U.C.: have been involved in

479 designing, drafting and revising the manuscript critically for important intellectual
480 content. All authors reviewed and corrected the manuscript.

481

482 Reference

483 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA 2001. Resolução RDC nº 12,
484 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para
485 alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de 10 de janeiro de 2001. [http://elegis.
486 anvisa.gov.br/leisref/public/](http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/) Accessed 23 setembro 2013.

487 AOCS 2004. Official methods and recommended practices of the American Oil
488 Chemists' Society. AOCS, Champaign.

489 Arihara K, Itoh M. 2000. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium
490 choride and sodium nitrite for meat fermentation. Int J Food Microbiol 56:227-230.

491 Ammor MS, Mayo B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as
492 functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Sci 76:138–46.
493 doi: 10.1016/j.meatsci.2006.10.022

494 Bedani R. 2008. Influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com
495 *Enterococcus faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos.
496 122f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição- Ciência dos Alimentos) –
497 Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

498 Cavallini DCU, Abdalla DS, Vendramini RC, Bedani R, Bomdespacho LQ, Pauly-
499 Silveira ND, de Valdez GF, Rossi EA. 2009. Effects of isoflavone-supplemented soy
500 yogurt on lipid parameters and atherosclerosis development in hypercholesterolemic
501 rabbits: a randomized double-blind study. Lip. Health Dis 8:40. DOI: 10.1186/1476-
502 511X-8-40.

503 Cavallini DCU, Suzuki JY, Abdalla DSP, Vendramini RC, Pauly-Silveira ND,
504 Roselino MN, Pinto RA, Rossi EA. 2011. Influence of a probiotic soy product on
505 fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model.
506 Lipids in Health and Disease. DOI:10.1186/1476-511X-10-126.

507 Celiberto LS. 2014. “Efeito de uma bebida probiótica (*Enterococcus faecium* CRL 183
508 e *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) à base de extrato aquoso de soja no
509 desenvolvimento de colite quimicamente induzida em ratos” 105f. Dissertação
510 apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista
511 “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e
512 Nutrição, área Ciência dos Alimentos.

- 513 Codex Alimentarius. Current official standards - Codex Stan (210). 1999. "Standard for
514 named vegetable oils" e "Standard for fats and oils not covered by individual
515 standards". Revised, 2009. Available:
516 http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=336
- 517 Coman MM, Cecchini C, Verdenelli MC, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. 2012.
518 Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. Int
519 J Food Microbiol 157:346–352.
- 520 Dransfield E. 2008. The taste of fat. Meat Science 80:37-42. doi:
521 10.1016/j.meatsci.2008.05.030.
- 522 Downes FP, Ito K. 2002. Compendium of methods for microbiological
523 examination of foods. American Public Health Association. 4edn. Washington, pp 659.
- 524 Fernandez C G, Santos E M, Jaime I, Rovira J. 1997. Use of starter cultures in
525 dry fermented sausage (chorizo) and their influence on the sensory properties.
526 Food Science and Technology International 3:1-42.
- 527 Folch J, Lees M, Sloane SGH. 1957. A simple method for the isolation and purification
528 of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 226(1):497-509.
- 529 Fonseca SH. 1999. Sobrevivência de *Listeria innocua* em salame italiano. 97 f.
530 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de
531 Viçosa, Viçosa.
- 532 Gunstone FD, Harwood J.L. 2007. Occurrence and characterization of oils and fats. In:
533 Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ eds. The Lipid Handbook. Boca Raton: CRC
534 press 37-52.
- 535 Hartman L, Lago RAC. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab Pract
536 22:475 – 476.
- 537
- 538 Hayes SC, Barnes-Holmes D, Roche B. 2001. Relational Frame Theory: A Post-
539 Skinnerian account of human language and cognition. New York: Plenum Press.
- 540
- 541• Hill C, G Francisco, Reid Gregor, Gibson GR, Merestein DJ, Pot B, Morelli L, Canani
542 RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. The International Scientific
543 Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and
544 appropriate use of the term probiotic. Hepatol. 11:506–514 .
- 545 Inoue N, Ohara Y, Fukai T, Harrison DG, Nishida K. 1998. Probucol improves
546 endothelial dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in
547 cholesterol-fed rabbits. Am J Med Sci 242-247.

- 548 Jay J. 1994. Microbiología Moderna de los Alimentos. 3 ed. Zaragoza: Acribia 804.
- 549 Karel M, Young S. 1981. Autoxidation-initiated reactions in foods. In: Rockland LB
550 and Stewart GF eds. Water activity: influences on food activity. Academic Press 511.
- 551 Kinouchi FL. 2006. “Iogurte” de soja como coadjuvante no tratamento de cancer de
552 mama. 85f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências
553 Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- 554 Koutsopoulos DA, Koutsimanis GE, Bloukas JG. 2008. Effect of carrageenan level and
555 packaging during ripening on processing and quality characteristics of low-fat
556 fermented sausages produced with olive oil. *Meat science* 79(1):188–97.
557 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062612> [Accessed September 3, 2014].
- 558 Lai SM, Gray JJ, Smith DM, Booren AM, Crackel RL, Buckley DJ. 1991. Effects of
559 oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the
560 development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. *J Food Sci*
561 56(3):616.
- 562 Lewus CB, Kaiser A, Montville TJ. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens
563 by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental*
564 *Microbiology* 57(6):1683–1688.
- 565 Liaros NG, Katsanidis E, Bloukas JG. 2009. Effect of the ripening time under vacuum
566 and packaging film permeability on processing and quality characteristics of low-fat
567 fermented sausages. *Meat science* 83(4):589–98 Available at:
568 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20416653> [Accessed September 11, 2014].
- 569 Macedo REF, Pflanzner Jr SB, Terra NN, Freitas RJS. 2008. Desenvolvimento de
570 embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade.
571 *Ciênc Tecnol Alim* 28:509-519.
- 572 Macedo REF. 2005. Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de
573 produto cárneo. 210p. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.
- 574 MAPA-Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa
575 nº 22 de 31 de julho de 2000, SDA/DIPOA. Aprovar os Regulamentos Técnicos
576 de Identidade e Qualidade <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Accessed 23 june
577 2013.
- 578 Marangoni C. 2007. Atividade antioxidante do óleo essencial de coentro (*Coriandrum*
579 *sativum* L.) em salame italiano. 132 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências
580 Ambientais) – Programa de Pós – graduação em Ciências Ambientais, Universidade
581 Comunitária Regional de Chapecó. Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

- 582 Menezes RS, Leles MIG, Soares A T, Franco PIBEM., Antoniosi Filho NR, Sant'Anna
583 CL, Vieira AAH. 2013. Quim. Nova 36:10.
- 584 Muguerza E, Ansorena D, Astiasarán I. 2003. Improvement of nutritional propeties
585 of Chorizo of Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Science*
586 64(4):1361-1367.
- 587 Muthukumarasamy P, Holley R. 2007. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry
588 fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food*
589 *microbiology* 24(1):pp.82–8 Available at:
590 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16943098> [Accessed September 11, 2014].
- 591• Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou, P. 2003.
592 Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in
593 respect of their technological and probiotic properties. *Meat science* 65(2):859–67
594 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22063449> [Accessed September 11,
595 2014].
- 596 Pidcock K, Heard GM, Henrikson A. 2002. Application of nontraditional meat starter
597 cultures in production of Hungarian salami. *Int J Food Microbiol* v76:75-81.
- 598 Ross RP, Morgan S, Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and
599 future. *International Journal Food Microbiology* 79(1-2):3-16.
600
- 601 Rossi EA, De Giorgi GS, De Ruiz Holgado AP, De Valdez GF. 1994. In vitro effect
602 of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* on cholesterol.
603 *Microbiologie-aliments-nutrition* 12:267-270.
604
- 605 Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, de Oliveira MG, de Valdez GF. 2000. Effects of
606 a novel fermented soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic
607 rabbits. *Arq. Bras. Cardiol* 74:213-216.
608
- 609 Rossi EA, Vendramini RC, Carlos IZ, Oliveira MG, Valdez GF. 2003. Efeito de um
610 novo produto fermentado de soja sobre lípides séricos de homens adultos
611 normocolesterolêmicos. *Arch. Latinoam. Nutr* 53(1).
612
- 613 Rossi EA, Cavallini DCU, Carlos IZ, Vendramini RC, Dâmaso AR, VALDEZ GF.
614 2008. Intake of isoflavone-supplemented soy yogurt fermented with *Enterococcus*
615 *faecium* lowers serum total cholesterol and non-HDL cholesterol of
616 hypercholesterolemic rats. *Eur. Food Res. Technol.* DOI: 10.1007/s00217-008-0932-9.
617

- 618 Rubio R, Aymerich T, Bover-Cid S, Guàrdia MD, Arnau J, Garriga M. 2013a.
619 Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299 V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as
620 starter cultures for fermented sausages. *LWT Food Sci Technol* 54:51–56.
621
- 622 Rubio R, Martín B, Aymerich T, Garriga M. 2014. The potential probiotic
623 *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the
624 gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally
625 enhanced fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 186:55–
626 60.
627
- 628 Sameshima T, Mangome C, Takeshita K, Arihara K, Itoh M, Kondo Y. 1998 Effect of
629 intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus*
630 in fermented sausage. *Int J Food Microbiol* 41:1–7.
- 631 Severini C, Pilli TD, Baiano A. 2003. Partial substitution of pork backfat with extra-
632 virgin olive oil in “salami” products: effects on chemical, physical and sensorial
633 quality. *Meat Science* 64:323–331. doi: 10.1016/S0309-1740(02)00204-8.
- 634 Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. 1999. Métodos para avaliação do grau
635 de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova* 22(1):94-103.
636 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40421999000100016>.
- 637 Silva C, Lima AP, Castilhos F, Cardozo Filho L, Oliveira JV. 2011. Non-catalytic
638 production of fatty acid esters from soybean oil with supercritical ethanol in a two-step
639 process using a microtube reactor. *Biomass & Bioenergy* 35:526-532.
- 640 Siqueira S. (1995) Manual de microbiologia de alimentos. Brasília: Embrapa 159.
- 641 Sivieri K, Spinardi-Barbisan ALT, Barbisan LF, Bedani R, Pauly ND, Carlos IZ,
642 Benzatti F, Gomes E, Rossi EA. 2008. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183
643 inhibit chemically induced colon cancer in male rats. *European Food Research*
644 *and Technology* 228:231-237.
- 645 Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. 2001. Manual de métodos de análise
646 microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, p.317.
- 647 Terra NN. 1998. Apontamentos de Tecnologia de Carnes. São Leopoldo: UNISINOS,
648 p.216.
- 649 Työppönen S, Petäjä E, Mattila-Sandholm T. 2003. Bioprotectives and probiotics for
650 dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83(3), pp.233–244.
651 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160502003793> [Accessed
652 September 11, 2014].

Table 1. Viable cell population of *Enterococcus faecium* CRL183 and *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 exposed to different concentrations of NaCl and NaNO₂.

Curing salt concentration		Viable cells (log CFU/mL)	
		<i>Enterococcus faecium</i> CRL 183	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1014
NaCl (%)	0	9.44 ^b ± 0.08	9.41 ^a ± 0.07
	1	9.77 ^a ± 0.02	8.11 ^b ± 0.01
	1.5	9.73 ^a ± 0.02	8.11 ^b ± 0.04
	2	9.66 ^a ± 0.03	8.15 ^b ± 0.03
	2.5	9.52 ^b ± 0.05	8.10 ^b ± 0.09
	3	9.39 ^b ± 0.07	8.14 ^b ± 0.06
NaNO ₂ (ppm)	0	9.41 ^{b, c} ± 0.05	9.43 ^a ± 0.03
	80	9.61 ^a ± 0.07	8.92 ^{b, c} ± 0.01
	100	9.53 ^{a, b} ± 0.03	8.93 ^b ± 0.02
	120	9.43 ^{b, c} ± 0.03	8.89 ^{b, c, d} ± 0.01
	150	9.41 ^{b, c} ± 0.10	8.96 ^b ± 0.01
	200	9.34 ^c ± 0.06	8.85 ^d ± 0.01

Means with the same letter in the same column do not differ from the Tukey test (p<0,05).

664 Table 2. Mean values ($\pm$ standard deviations) for water activity and pH during the study period.

Time/Attributes	Treatments						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
T0							
pH	5.96 ^{aA} $\pm$ 0.36	5.99 ^{aA} $\pm$ 0.05	6.11 ^{aA} $\pm$ 0.07	6.02 ^{aA} $\pm$ 0.19	6.08 ^{aA} $\pm$ 0.13	5.59 ^{aA} $\pm$ 0.21	5.87 ^{aA} $\pm$ 0.08
Wa	0.984 ^{aA} $\pm$ 0.010	1.000 ^{aA} $\pm$ 0.015	1.000 ^{aA} $\pm$ 0.013	0.998 ^{aA} $\pm$ 0.001	0.981 ^{aA} $\pm$ 0.022	0.997 ^{aA} $\pm$ 0.002	0.981 ^{aA} $\pm$ 0.016
T7							
pH	5.11 ^{aB} $\pm$ 0.20	4.97 ^{aBC} $\pm$ 0.08	5.15 ^{aBC} $\pm$ 0.10	5.03 ^{aB} $\pm$ 0.09	5.15 ^{aCD} $\pm$ 0.12	4.99 ^{aB} $\pm$ 0.18	5.14 ^{aBC} $\pm$ 0.05
Wa	0.978 ^{aA} $\pm$ 0.012	0.996 ^{aA} $\pm$ 0.007	0.998 ^{aA} $\pm$ 0.014	0.971 ^{aA} $\pm$ 0.001	0.993 ^{aA} $\pm$ 0.006	0.992 ^{aA} $\pm$ 0.002	0.982 ^{aAB} $\pm$ 0.003
T30							
pH	5.21 ^{aB} $\pm$ 0.28	5.19 ^{aB} $\pm$ 0.22	5.26 ^{aB} $\pm$ 0.14	4.98 ^{aB} $\pm$ 0.16	5.25 ^{aBCD} $\pm$ 0.07	5.11 ^{aB} $\pm$ 0.03	5.04 ^{aC} $\pm$ 0.20
Wa	0.916 ^{aAB} $\pm$ 0.026	0.921 ^{aB} $\pm$ 0.008	0.915 ^{aB} $\pm$ 0.017	0.912 ^{aB} $\pm$ 0.027	0.910 ^{aB} $\pm$ 0.023	0.893 ^{aB} $\pm$ 0.038	0.916 ^{aBC} $\pm$ 0.053
T60							
pH	5.14 ^{bB} $\pm$ 0.23	5.03 ^{bB} $\pm$ 0.11	5.05 ^{bC} $\pm$ 0.15	4.88 ^{bB} $\pm$ 0.16	5.53 ^{aB} $\pm$ 0.33	5.12 ^{bB} $\pm$ 0.01	5.02 ^{bC} $\pm$ 0.14
Wa	0.852 ^{aBC} $\pm$ 0.042	0.863 ^{aC} $\pm$ 0.012	0.870 ^{aBC} $\pm$ 0.050	0.908 ^{aB} $\pm$ 0.009	0.844 ^{aC} $\pm$ 0.032	0.843 ^{aBC} $\pm$ 0.028	0.851 ^{aC} $\pm$ 0.062
T90							
pH	5.13 ^{bB} $\pm$ 0.30	5.09 ^{bB} $\pm$ 0.05	5.18 ^{bBC} $\pm$ 0.04	4.98 ^{aA} $\pm$ 0.01	4.98 ^{bB} $\pm$ 0.14	5.02 ^{bB} $\pm$ 0.10	5.12 ^{bBC} $\pm$ 0.05
Wa	0.820 ^{aC} $\pm$ 0.054	0.832 ^{aC} $\pm$ 0.046	0.835 ^{aC} $\pm$ 0.001	0.869 ^{aB} $\pm$ 0.005	0.851 ^{aCD} $\pm$ 0.016	0.810 ^{aCD} $\pm$ 0.011	0.859 ^{aCD} $\pm$ 0.002
T120							
pH	5.46 ^{aAB} $\pm$ 0.56	4.47 ^{bC} $\pm$ 0.71	5.17 ^{abBC} $\pm$ 0.11	5.02 ^{abB} $\pm$ 0.18	5.39 ^{aBC} $\pm$ 0.27	4.97 ^{abB} $\pm$ 0.18	5.48 ^{aB} $\pm$ 0.43
Wa	0.810 ^{aC} $\pm$ 0.079	0.828 ^{aC} $\pm$ 0.067	0.769 ^{aD} $\pm$ 0.051	0.828 ^{aC} $\pm$ 0.042	0.821 ^{aC} $\pm$ 0.066	0.753 ^{aD} $\pm$ 0.072	0.820 ^{aD} $\pm$ 0.052

665 F1 - traditional cultures without curing fat and curing salt reduction (0.015% nitrite and 0.005% nitrate); F2 - traditional cultures without curing salt reduction; F3 – traditional
666 cultures with curing salt reduction (0.007% nitrite and 0.003% nitrate); F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salt reduction,
667 respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salt reduction, respectively. T0 = initial time; T7 = end of the fermentation
668 period; T30 = end of the ripening period; T60, T90 and T120 = storage time at 4 ° C. Analysis of treatments: means with the same lowercase letters in the same line, at the
669 same time interval, do not differ from the Tukey test (p <0.05). Analysis of time: means with capital letters for the same formulation at different times, do not differ from the
670 Tukey test (p <0.05).

671 Table 3. Mean values ($\pm$ standard deviations) of TBARS for different treatments and
672 processing steps.

	T0	T7	T30	T60	T90	T120
F1	2.30 ^{aF} $\pm$ 0.27	3.61 ^{aE} $\pm$ 0.24	5.27 ^{aD} $\pm$ 0.22	6.27 ^{aC} $\pm$ 0.20	8.53 ^{aB} $\pm$ 0.26	9.44 ^{aA} $\pm$ 0.30
F2	1.12 ^{cD} $\pm$ 0.10	2.35 ^{bcC} $\pm$ 0.42	4.85 ^{abB} $\pm$ 0.10	5.67 ^{bA} $\pm$ 0.25	5.03 ^{cdB} $\pm$ 0.31	4.61 ^{bB} $\pm$ 0.24
F3	1.42 ^{bcD} $\pm$ 0.37	2.41 ^{bcC} $\pm$ 0.26	4.42 ^{bcB} $\pm$ 0.18	5.41 ^{bcA} $\pm$ 0.21	5.37 ^{bcA} $\pm$ 0.26	4.65 ^{bB} $\pm$ 0.28
F4	1.48 ^{bcD} $\pm$ 0.18	2.40 ^{bcC} $\pm$ 0.19	4.44 ^{bcB} $\pm$ 0.27	5.49 ^{bcA} $\pm$ 0.38	5.52 ^{bcA} $\pm$ 0.24	4.39 ^{bB} $\pm$ 0.33
F5	1.55 ^{bdD} $\pm$ 0.27	2.09 ^{cC} $\pm$ 0.08	4.16 ^{cb} $\pm$ 0.28	5.15 ^{ca} $\pm$ 0.19	4.78 ^{da} $\pm$ 0.48	3.77 ^{cb} $\pm$ 0.33
F6	1.24 ^{bcE} $\pm$ 0.17	2.63 ^{bdD} $\pm$ 0.20	4.22 ^{cC} $\pm$ 0.36	5.51 ^{bcA} $\pm$ 0.32	5.58 ^{bcA} $\pm$ 0.37	4.83 ^{bB} $\pm$ 0.08
F7	1.24 ^{bcD} $\pm$ 0.18	2.35 ^{bcC} $\pm$ 0.05	4.19 ^{cb} $\pm$ 0.17	5.49 ^{bcA} $\pm$ 0.23	5.69 ^{ba} $\pm$ 0.25	4.45 ^{bB} $\pm$ 0.38

673 F1 - traditional cultures without curing fat and curing salts reduction (nitrite and nitrate 0.015% 0.005%);
674 F2 - traditional cultures without curing salts reduction; F3 - traditional cultures with curing salts
675 reduction (nitrite and nitrate 0.007% 0.003%); F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183)
676 without and with curing salts reduction, respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus*
677 CRL1014) without and with curing salts reduction, respectively. T0 = initial time; T7 = end of the
678 fermentation period; T30 = end of the ripening period; T60, T90 and T120 = storage time at 4 ° C.
679 Analysis of treatments: means with the same lowercase letters in the same line, in the same time interval,
680 do not differ by Tukey test ($p < 0.05$). Analysis of time: means with capital letters for the same
681 formulation at different times, do not differ by Tukey test ($p < 0.05$).

682 Table 4. Mean values ($\pm$ standard deviations) obtained in the fatty acid profile for sausages obtained by different treatments and processing steps.

Fatty Acid	Treatments						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
T0							
C14:0 Myristic Acid	1.47 $\pm$ 0.02 ^{bB}	1.55 $\pm$ 0.00 ^{aB}	1.40 $\pm$ 0.02 ^{cA}	1.31 $\pm$ 0.01 ^{dB}	1.45 $\pm$ 0.01 ^{bB}	1.56 $\pm$ 0.00 ^{aA}	1.37 $\pm$ 0.00 ^{cA}
C16:0 Palmitic Acid	25.86 $\pm$ 0.06 ^{aA}	24.54 $\pm$ 0.02 ^{bB}	23.66 $\pm$ 0.14 ^{dB}	23.45 $\pm$ 0.05 ^{dC}	24.82 $\pm$ 0.02 ^{bB}	24.84 $\pm$ 0.01 ^{bA}	24.39 $\pm$ 0.01 ^{cA}
C16:1 Palmitoleic acid	2.55 $\pm$ 0.01 ^{cA}	2.67 $\pm$ 0.00 ^{aA}	1.97 $\pm$ 0.01 ^{fC}	2.43 $\pm$ 0.00 ^{eC}	2.55 $\pm$ 0.00 ^{cB}	2.64 $\pm$ 0.00 ^{bA}	2.46 $\pm$ 0.00 ^{dA}
C18:0 Stearic Acid	13.04 $\pm$ 0.01 ^{bC}	12.54 $\pm$ 0.01 ^{eC}	14.36 $\pm$ 0.04 ^{aA}	12.16 $\pm$ 0.01 ^{fC}	12.87 $\pm$ 0.00 ^{cdB}	12.92 $\pm$ 0.01 ^{cB}	12.82 $\pm$ 0.00 ^{dC}
C18:1n9c Oleic Acid	47.96 $\pm$ 0.06 ^{dA}	46.44 $\pm$ 0.01 ^{eC}	48.57 $\pm$ 0.11 ^{abA}	48.49 $\pm$ 0.03 ^{bcB}	48.35 $\pm$ 0.02 ^{cA}	46.40 $\pm$ 0.01 ^{eC}	48.14 $\pm$ 0.01 ^{dB}
C18:2n6c Linoleic Acid	8.27 $\pm$ 0.01 ^{eC}	11.47 $\pm$ 0.00 ^{aA}	9.29 $\pm$ 0.02 ^{eB}	11.39 $\pm$ 0.02 ^{bA}	9.21 $\pm$ 0.01 ^{fB}	10.95 $\pm$ 0.00 ^{cA}	10.06 $\pm$ 0.01 ^{dA}
C18:3n3 Alpha-Linolenic Acid	0.83 $\pm$ 0.00 ^{aA}	0.69 $\pm$ 0.00 ^{cB}	0.76 $\pm$ 0.01 ^{bA}	0.77 $\pm$ 0.00 ^{bA}	0.75 $\pm$ 0.00 ^{bA}	0.70 $\pm$ 0.01 ^{cC}	0.75 $\pm$ 0.00 ^{bA}
T30							
C14:0 Myristic Acid	1.48 $\pm$ 0.00 ^{cB}	1.61 $\pm$ 0.01 ^{aA}	1.37 $\pm$ 0.01 ^{dA}	1.45 $\pm$ 0.01 ^{cA}	1.57 $\pm$ 0.01 ^{bA}	1.32 $\pm$ 0.01 ^{eC}	1.32 $\pm$ 0.01 ^{eB}
C16:0 Palmitic Acid	25.64 $\pm$ 0.00 ^{aB}	25.45 $\pm$ 0.01 ^{bA}	24.49 $\pm$ 0.05 ^{deA}	24.39 $\pm$ 0.08 ^{eAB}	25.11 $\pm$ 0.01 ^{cA}	24.40 $\pm$ 0.02 ^{dB}	24.61 $\pm$ 0.01 ^{dA}
C16:1 Palmitoleic acid	2.51 $\pm$ 0.02 ^{cb}	2.77 $\pm$ 0.08 ^{aA}	2.51 $\pm$ 0.00 ^{cA}	2.56 $\pm$ 0.00 ^{bcA}	2.64 $\pm$ 0.01 ^{bA}	2.50 $\pm$ 0.00 ^{cB}	2.28 $\pm$ 0.00 ^{dB}
C18:0 Stearic Acid	13.19 $\pm$ 0.01 ^{bB}	12.82 $\pm$ 0.02 ^{dB}	13.04 $\pm$ 0.02 ^{cC}	12.79 $\pm$ 0.02 ^{dB}	12.82 $\pm$ 0.01 ^{dB}	12.99 $\pm$ 0.01 ^{cA}	13.28 $\pm$ 0.01 ^{aB}
C18:1n9c Oleic Acid	46.64 $\pm$ 0.02 ^{fB}	47.59 $\pm$ 0.07 ^{eB}	48.58 $\pm$ 0.03 ^{bA}	48.79 $\pm$ 0.05 ^{aA}	48.18 $\pm$ 0.00 ^{dA}	48.80 $\pm$ 0.01 ^{aB}	48.41 $\pm$ 0.00 ^{cA}
C18:2n6c Linoleic Acid	9.75 $\pm$ 0.00 ^{aB}	9.09 $\pm$ 0.01 ^{dA}	9.27 $\pm$ 0.01 ^{cB}	9.28 $\pm$ 0.01 ^{bcC}	8.98 $\pm$ 0.02 ^{eC}	9.23 $\pm$ 0.00 ^{cB}	9.32 $\pm$ 0.01 ^{bC}
C18:3n3 Alpha-Linolenic Acid	0.80 $\pm$ 0.01 ^{dB}	0.67 $\pm$ 0.00 ^{fB}	0.75 $\pm$ 0.00 ^{cdA}	0.74 $\pm$ 0.00 ^{dBbA}	0.70 $\pm$ 0.00 ^{eB}	0.76 $\pm$ 0.00 ^{bcB}	0.77 $\pm$ 0.01 ^{bA}
T120							
C14:0 Myristic Acid	1.60 $\pm$ 0.00 ^{aA}	1.44 $\pm$ 0.01 ^{bC}	1.39 $\pm$ 0.00 ^{cA}	1.43 $\pm$ 0.01 ^{bA}	1.44 $\pm$ 0.01 ^{bB}	1.46 $\pm$ 0.01 ^{bB}	1.36 $\pm$ 0.00 ^{cA}
C16:0 Palmitic Acid	25.89 $\pm$ 0.03 ^{aA}	24.30 $\pm$ 0.04 ^{dC}	24.58 $\pm$ 0.04 ^{cA}	24.26 $\pm$ 0.01 ^{dB}	24.87 $\pm$ 0.13 ^{bAB}	23.51 $\pm$ 0.00 ^{eC}	24.45 $\pm$ 0.03 ^{cdB}
C16:1 Palmitoleic acid	2.26 $\pm$ 0.00 ^{dC}	2.45 $\pm$ 0.02 ^{ab^{cB}}	2.40 $\pm$ 0.02 ^{cB}	2.49 $\pm$ 0.02 ^{abB}	2.39 $\pm$ 0.03 ^{cC}	2.52 $\pm$ 0.00 ^{aB}	2.45 $\pm$ 0.02 ^{bcA}
C18:0 Stearic Acid	14.74 $\pm$ 0.00 ^{aA}	13.25 $\pm$ 0.01 ^{dA}	13.53 $\pm$ 0.01 ^{bcB}	13.26 $\pm$ 0.00 ^{dA}	12.15 $\pm$ 0.03 ^{fC}	12.79 $\pm$ 0.00 ^{eC}	13.51 $\pm$ 0.02 ^{cA}
C18:1n9c Oleic Acid	44.29 $\pm$ 0.04 ^{eD}	48.36 $\pm$ 0.07 ^{bA}	47.40 $\pm$ 0.05 ^{dB}	48.37 $\pm$ 0.02 ^{bC}	47.22 $\pm$ 0.09 ^{dB}	50.41 $\pm$ 0.00 ^{aA}	48.04 $\pm$ 0.01 ^{cC}
C18:2n6c Linoleic Acid	10.40 $\pm$ 0.00 ^{bA}	9.47 $\pm$ 0.00 ^{dB}	9.94 $\pm$ 0.01 ^{cA}	9.45 $\pm$ 0.00 ^{dB}	11.19 $\pm$ 0.04 ^{aA}	8.52 $\pm$ 0.00 ^{eC}	9.45 $\pm$ 0.02 ^{dB}
C18:3n3 Alpha-Linolenic Acid	0.83 $\pm$ 0.01 ^{aA}	0.73 $\pm$ 0.00 ^{dA}	0.77 $\pm$ 0.01 ^{cA}	0.74 $\pm$ 0.01 ^{dB}	0.75 $\pm$ 0.00 ^{dA}	0.79 $\pm$ 0.00 ^{bA}	0.75 $\pm$ 0.00 ^{cdA}

683 F1 - traditional cultures without curing fat and curing salts reduction (nitrite and nitrate 0.015% 0.005%); F2 - traditional cultures without curing salts reduction; F3 –
684 traditional cultures with curing salts reduction (nitrite and nitrate 0.007% 0.003%); F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salts reduction,
685 respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salts reduction, respectively. T0 = initial time; T30 = end of the ripening period;

686 T120 = storage time at 4 ° C. Analysis of treatments: means with the same lowercase letters in the same line, in the same time interval, do not differ by Tukey test ($p < 0.05$).
687 Analysis of time: means with capital letters for the same formulation at different times, do not differ by Tukey test ($p < 0.05$).
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715

For Peer Review

Table 5. Viability of probiotic microorganisms during the trial period.

	<i>Enterococcus</i> spp. (log UFC/g)		<i>Lactobacillus</i> spp. (log UFC/g)	
	F4	F5	F6	F7
T0	6.82 ^{aC} ±0.82	6.96 ^{aB} ±1.04	6.78 ^{bB} ±0.04	7.60 ^{aA} ±0.17
T7	8.09 ^{aAB} ±0.76	7.40 ^{aAB} ±0.53	8.37 ^{aA} ±0.54	7.63 ^{aA} ±0.76
T30	8.54 ^{aA} ±0.50	7.98 ^{aA} ±0.08	8.52 ^{aA} ±0.36	8.45 ^{aA} ±0.19
T60	7.44 ^{aABC} ±0.15	8.36 ^{aAB} ±0.54	8.36 ^{aA} ±0.54	7.83 ^{aA} ±0.47
T90	7.40 ^{aABC} ±0.19	7.63 ^{aAB} ±0.20	8.15 ^{aA} ±0.29	7.72 ^{aA} ±0.89
T120	7.15 ^{aABC} ±0.03	7.18 ^{aAB} ±0.27	7.73 ^{aA} ±0.09	7.35 ^{aA} ±0.43

F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salt reduction, respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salt reduction, respectively. T0 = initial time; T7 = end of the fermentation period; T30 = end of the ripening period; T60, T90 and T120 = storage time at 4 ° C. Means followed by the same lower case letters in a line and capital letters on the column do not differ from Tukey test (p<0,05).

727 Table 6. Means for population of potentially pathogenic microorganisms - microbiological safety.

		Positive coagulase staphylococci (log UFC/g)	Coliforms 45°C/ <i>E.coli</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>C.botulinum</i>
T0	F1	4.97 ^{aA} ±0.59	3.52 ^{aA} ±0.16	Absent	Absent	Absent
	F2	4.35 ^{aA} ±0.10	3.32 ^{aA} ±0.16	Absent	Absent	Absent
	F3	4.30 ^{aA} ±0.71	3.50 ^{aA} ±0.11	Absent	Absent	Absent
	F4	4.25 ^{aA} ±0.77	3.36 ^{aA} ±0.11	Absent	Absent	Absent
	F5	4.19 ^{aA} ±0.11	3.53 ^{aA} ±0.24	Absent	Absent	Absent
	F6	4.38 ^{aA} ±0.09	3.59 ^{aA} ±0.10	Absent	Absent	Absent
	F7	3.77 ^{bA} ±0.61	3.53 ^{aA} ±0.05	Absent	Absent	Absent
T7	F1	3.81 ^{aB} ±0.44	2.18 ^{aB} ±0.00	Absent	Absent	Absent
	F2	3.74 ^{aB} ±0.07	1.86 ^{aB} ±0.53	Absent	Absent	Absent
	F3	3.73 ^{aA} ±0.02	2.24 ^{aB} ±0.09	Absent	Absent	Absent
	F4	4.25 ^{aA} ±0.77	2.27 ^{aB} ±0.05	Absent	Absent	Absent
	F5	3.42 ^{aAB} ±0.54	2.35 ^{aB} ±0.07	Absent	Absent	Absent
	F6	3.76 ^{aB} ±0.05	2.27 ^{aB} ±0.01	Absent	Absent	Absent
	F7	3.34 ^{aA} ±0.40	2.07 ^{aB} ±0.16	Absent	Absent	Absent
T30	F1	3.59 ^{aB} ±0.12	< 1	Absent	Absent	Absent
	F2	3.68 ^{aB} ±0.19	< 1	Absent	Absent	Absent
	F3	3.70 ^{aA} ±0.01	< 1	Absent	Absent	Absent
	F4	3.69 ^{aA} ±0.06	< 1	Absent	Absent	Absent
	F5	3.45 ^{aAB} ±0.49	< 1	Absent	Absent	Absent
	F6	3.70 ^{aB} ±0.02	< 1	Absent	Absent	Absent
	F7	3.64 ^{aA} ±0.21	< 1	Absent	Absent	Absent
T60	F1	3.56 ^{aB} ±0.11	< 1	Absent	Absent	Absent
	F2	3.69 ^{aBC} ±0.32	< 1	Absent	Absent	Absent
	F3	3.69 ^{aA} ±0.07	< 1	Absent	Absent	Absent
	F4	3.68 ^{aA} ±0.03	< 1	Absent	Absent	Absent

	F5	3.01 ^{aAB} ±0.70	< 1	Absent	Absent	Absent
	F6	3.60 ^{aB} ±0.30	< 1	Absent	Absent	Absent
	F7	3.59 ^{aA} ±0.48	< 1	Absent	Absent	Absent
T90	F1	3.35 ^{aB} ±0.08	< 1	Absent	Absent	Absent
	F2	3.57 ^{aBC} ±0.33	< 1	Absent	Absent	Absent
	F3	3.66 ^{aA} ±0.08	< 1	Absent	Absent	Absent
	F4	3.59 ^{aA} ±0.20	< 1	Absent	Absent	Absent
	F5	3.29 ^{aAB} ±0.03	< 1	Absent	Absent	Absent
	F6	3.69 ^{aB} ±0.12	< 1	Absent	Absent	Absent
	F7	3.62 ^{aA} ±0.02	< 1	Absent	Absent	Absent
T120	F1	3.23 ^{aB} ±0.07	< 1	Absent	Absent	Absent
	F2	3.17 ^{aC} ±0.03	< 1	Absent	Absent	Absent
	F3	3.46 ^{aA} ±0.51	< 1	Absent	Absent	Absent
	F4	3.06 ^{aA} ±0.26	< 1	Absent	Absent	Absent
	F5	2.61 ^{bB} ±0.01	< 1	Absent	Absent	Absent
	F6	3.66 ^{aB} ±0.12	< 1	Absent	Absent	Absent
	F7	3.63 ^{aA} ±0.31	< 1	Absent	Absent	Absent

728 F1 - traditional cultures without curing fat and curing salt reduction (0.015% nitrite and 0.005% nitrate); F2 - traditional cultures without curing salt reduction; F3 – traditional cultures
729 with curing salt reduction (0.007% nitrite and 0.003% nitrate); F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salt reduction, respectively; F6 and F7 -
730 probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salt reduction, respectively. T0 = initial time; T7 = end of the fermentation period; T30 = end of the ripening period;
731 T60, T90 and T120 = storage time at 4 ° C. Means followed by the same lower case letters in a line and capital letters on the column do not differ from Tukey test (p<0,05).
732
733

734

Table 1. Viable cell population of *Enterococcus faecium* CRL183 and *Lactobacillus acidophilus* CRL1014 exposed to different concentrations of NaCl and NaNO₂.

Curing salt concentration		Viable cells (log CFU/mL)	
		<i>Enterococcus faecium</i> CRL 183	<i>Lactobacillus acidophilus</i> CRL 1014
NaCl (%)	0	9.44 ^b ± 0.08	9.41 ^a ± 0.07
	1	9.77 ^a ± 0.02	8.11 ^b ± 0.01
	1.5	9.73 ^a ± 0.02	8.11 ^b ± 0.04
	2	9.66 ^a ± 0.03	8.15 ^b ± 0.03
	2.5	9.52 ^b ± 0.05	8.10 ^b ± 0.09
	3	9.39 ^b ± 0.07	8.14 ^b ± 0.06
NaNO ₂ (ppm)	0	9.41 ^{b, c} ± 0.05	9.43 ^a ± 0.03
	80	9.61 ^a ± 0.07	8.92 ^{b, c} ± 0.01
	100	9.53 ^{a, b} ± 0.03	8.93 ^b ± 0.02
	120	9.43 ^{b, c} ± 0.03	8.89 ^{b, c, d} ± 0.01
	150	9.41 ^{b, c} ± 0.10	8.96 ^b ± 0.01
	200	9.34 ^c ± 0.06	8.85 ^d ± 0.01

Means with the same letter in the same column do not differ from the Tukey test (p<0,05).

Table 2. Mean values (± standard deviations) for water activity and pH during the study period.

Time/Attributes	Treatments						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
T0							
pH	5.96 ^{aA} ±0.36	5.99 ^{aA} ±0.05	6.11 ^{aA} ±0.07	6.02 ^{aA} ±0.19	6.08 ^{aA} ±0.13	5.59 ^{aA} ±0.21	5.87 ^{aA} ±0.08
Wa	0.984 ^{aA} ±0.010	1.000 ^{aA} ±0.015	1.000 ^{aA} ±0.013	0.998 ^{aA} ±0.001	0.981 ^{aA} ±0.022	0.997 ^{aA} ±0.002	0.981 ^{aA} ±0.016
T7							
pH	5.11 ^{aB} ±0.20	4.97 ^{aBC} ±0.08	5.15 ^{aBC} ±0.10	5.03 ^{aB} ±0.09	5.15 ^{aCD} ±0.12	4.99 ^{aB} ±0.18	5.14 ^{aBC} ±0.05
Wa	0.978 ^{aA} ±0.012	0.996 ^{aA} ±0.007	0.998 ^{aA} ±0.014	0.971 ^{aA} ±0.001	0.993 ^{aA} ±0.006	0.992 ^{aA} ±0.002	0.982 ^{aAB} ±0.003
T30							
pH	5.21 ^{aB} ±0.28	5.19 ^{aB} ±0.22	5.26 ^{aB} ±0.14	4.98 ^{aB} ±0.16	5.25 ^{aBCD} ±0.07	5.11 ^{aB} ±0.03	5.04 ^{aC} ±0.20
Wa	0.916 ^{aAB} ±0.026	0.921 ^{aB} ±0.008	0.915 ^{aB} ±0.017	0.912 ^{aB} ±0.027	0.910 ^{aB} ±0.023	0.893 ^{aB} ±0.038	0.916 ^{aBC} ±0.053
T60							
pH	5.14 ^{bB} ±0.23	5.03 ^{bB} ±0.11	5.05 ^{bC} ±0.15	4.88 ^{bB} ±0.16	5.53 ^{aB} ±0.33	5.12 ^{bB} ±0.01	5.02 ^{bC} ±0.14
Wa	0.852 ^{aBC} ±0.042	0.863 ^{aC} ±0.012	0.870 ^{aBC} ±0.050	0.908 ^{aB} ±0.009	0.844 ^{aC} ±0.032	0.843 ^{aBC} ±0.028	0.851 ^{aC} ±0.062
T90							
pH	5.13 ^{bB} ±0.30	5.09 ^{bB} ±0.05	5.18 ^{bBC} ±0.04	4.98 ^{aA} ±0.01	4.98 ^{bB} ±0.14	5.02 ^{bB} ±0.10	5.12 ^{bBC} ±0.05
Wa	0.820 ^{aC} ±0.054	0.832 ^{aC} ±0.046	0.835 ^{aC} ±0.001	0.869 ^{aB} ±0.005	0.851 ^{aCD} ±0.016	0.810 ^{aCD} ±0.011	0.859 ^{aCD} ±0.002
T120							
pH	5.46 ^{aAB} ±0.56	4.47 ^{bC} ±0.71	5.17 ^{abBC} ±0.11	5.02 ^{abB} ±0.18	5.39 ^{aBC} ±0.27	4.97 ^{abB} ±0.18	5.48 ^{aB} ±0.43
Wa	0.810 ^{aC} ±0.079	0.828 ^{aC} ±0.067	0.769 ^{aD} ±0.051	0.828 ^{aC} ±0.042	0.821 ^{aC} ±0.066	0.753 ^{aD} ±0.072	0.820 ^{aD} ±0.052

F1 - traditional cultures without curing fat and curing salt reduction (0.015% nitrite and 0.005% nitrate); F2 - traditional cultures without curing salt reduction; F3 – traditional cultures with curing salt reduction (0.007% nitrite and 0.003% nitrate); F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salt reduction, respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salt reduction, respectively. T0 = initial time; T7 = end of the fermentation period; T30 = end of the ripening period; T60, T90 and T120 = storage time at 4 ° C. Analysis of treatments: means with the same lowercase letters in the same line, at the same time interval, do not differ from the Tukey test (p <0.05). Analysis of time: means with capital letters for the same formulation at different times, do not differ from the Tukey test (p <0.05).

Table 3. Mean values ($\pm$ standard deviations) of TBARS for different treatments and processing steps.

	T0	T7	T30	T60	T90	T120
F1	2.30 ^{aF} $\pm$ 0.27	3.61 ^{aE} $\pm$ 0.24	5.27 ^{aD} $\pm$ 0.22	6.27 ^{aC} $\pm$ 0.20	8.53 ^{aB} $\pm$ 0.26	9.44 ^{aA} $\pm$ 0.30
F2	1.12 ^{cD} $\pm$ 0.10	2.35 ^{bcC} $\pm$ 0.42	4.85 ^{abB} $\pm$ 0.10	5.67 ^{bA} $\pm$ 0.25	5.03 ^{cdB} $\pm$ 0.31	4.61 ^{bB} $\pm$ 0.24
F3	1.42 ^{bcD} $\pm$ 0.37	2.41 ^{bcC} $\pm$ 0.26	4.42 ^{bcB} $\pm$ 0.18	5.41 ^{bcA} $\pm$ 0.21	5.37 ^{bcA} $\pm$ 0.26	4.65 ^{bB} $\pm$ 0.28
F4	1.48 ^{bcD} $\pm$ 0.18	2.40 ^{bcC} $\pm$ 0.19	4.44 ^{bcB} $\pm$ 0.27	5.49 ^{bcA} $\pm$ 0.38	5.52 ^{bcA} $\pm$ 0.24	4.39 ^{bB} $\pm$ 0.33
F5	1.55 ^{bdD} $\pm$ 0.27	2.09 ^{cC} $\pm$ 0.08	4.16 ^{cB} $\pm$ 0.28	5.15 ^{ca} $\pm$ 0.19	4.78 ^{dA} $\pm$ 0.48	3.77 ^{cB} $\pm$ 0.33
F6	1.24 ^{bcE} $\pm$ 0.17	2.63 ^{bdD} $\pm$ 0.20	4.22 ^{cC} $\pm$ 0.36	5.51 ^{bcA} $\pm$ 0.32	5.58 ^{bcA} $\pm$ 0.37	4.83 ^{bB} $\pm$ 0.08
F7	1.24 ^{bcD} $\pm$ 0.18	2.35 ^{bcC} $\pm$ 0.05	4.19 ^{cB} $\pm$ 0.17	5.49 ^{bcA} $\pm$ 0.23	5.69 ^{bA} $\pm$ 0.25	4.45 ^{bB} $\pm$ 0.38

F1 - traditional cultures without curing fat and curing salts reduction (nitrite and nitrate 0.015% 0.005%); F2 - traditional cultures without curing salts reduction; F3 - traditional cultures with curing salts reduction (nitrite and nitrate 0.007% 0.003%); F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salts reduction, respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salts reduction, respectively. T0 = initial time; T7 = end of the fermentation period; T30 = end of the ripening period; T60, T90 and T120 = storage time at 4 ° C. Analysis of treatments: means with the same lowercase letters in the same line, in the same time interval, do not differ by Tukey test ($p < 0.05$). Analysis of time: means with capital letters for the same formulation at different times, do not differ by Tukey test ($p < 0.05$).

Table 4. Mean values (± standard deviations) obtained in the fatty acid profile for sausages obtained by different treatments and processing steps.

Fatty Acid	Treatments						
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
T0							
C14:0 Myristic Acid	1.47±0.02 ^{bB}	1.55±0.00 ^{aB}	1.40±0.02 ^{cA}	1.31±0.01 ^{dB}	1.45±0.01 ^{bB}	1.56±0.00 ^{aA}	1.37±0.00 ^{cA}
C16:0 Palmitic Acid	25.86±0.06 ^{aA}	24.54±0.02 ^{bB}	23.66±0.14 ^{dB}	23.45±0.05 ^{dC}	24.82±0.02 ^{bB}	24.84±0.01 ^{bA}	24.39±0.01 ^{cA}
C16:1 Palmitoleic acid	2.55±0.01 ^{cA}	2.67±0.00 ^{aA}	1.97±0.01 ^{fC}	2.43±0.00 ^{eC}	2.55±0.00 ^{cB}	2.64±0.00 ^{bA}	2.46±0.00 ^{dA}
C18:0 Stearic Acid	13.04±0.01 ^{bC}	12.54±0.01 ^{eC}	14.36±0.04 ^{aA}	12.16±0.01 ^{fC}	12.87±0.00 ^{cdB}	12.92±0.01 ^{cB}	12.82±0.00 ^{dC}
C18:1n9c Oleic Acid	47.96±0.06 ^{dA}	46.44±0.01 ^{eC}	48.57±0.11 ^{abA}	48.49±0.03 ^{bcB}	48.35±0.02 ^{cA}	46.40±0.01 ^{eC}	48.14±0.01 ^{dB}
C18:2n6c Linoleic Acid	8.27±0.01 ^{eC}	11.47±0.00 ^{aA}	9.29±0.02 ^{eB}	11.39±0.02 ^{bA}	9.21±0.01 ^{fB}	10.95±0.00 ^{cA}	10.06±0.01 ^{dA}
C18:3n3 Alpha-Linolenic Acid	0.83±0.00 ^{aA}	0.69±0.00 ^{cB}	0.76±0.01 ^{bA}	0.77±0.00 ^{bA}	0.75±0.00 ^{bA}	0.70±0.01 ^{cC}	0.75±0.00 ^{bA}
T30							
C14:0 Myristic Acid	1.48±0.00 ^{cB}	1.61±0.01 ^{aA}	1.37±0.01 ^{dA}	1.45±0.01 ^{cA}	1.57±0.01 ^{bA}	1.32±0.01 ^{eC}	1.32±0.01 ^{eB}
C16:0 Palmitic Acid	25.64±0.00 ^{ab}	25.45±0.01 ^{bA}	24.49±0.05 ^{deA}	24.39±0.08 ^{eAB}	25.11±0.01 ^{cA}	24.40±0.02 ^{eb}	24.61±0.01 ^{dA}
C16:1 Palmitoleic acid	2.51±0.02 ^{cb}	2.77±0.08 ^{aA}	2.51±0.00 ^{cA}	2.56±0.00 ^{bcA}	2.64±0.01 ^{bA}	2.50±0.00 ^{cB}	2.28±0.00 ^{dB}
C18:0 Stearic Acid	13.19±0.01 ^{bB}	12.82±0.02 ^{dB}	13.04±0.02 ^{cC}	12.79±0.02 ^{dB}	12.82±0.01 ^{dB}	12.99±0.01 ^{cA}	13.28±0.01 ^{ab}
C18:1n9c Oleic Acid	46.64±0.02 ^{fB}	47.59±0.07 ^{eB}	48.58±0.03 ^{bA}	48.79±0.05 ^{aA}	48.18±0.00 ^{dA}	48.80±0.01 ^{ab}	48.41±0.00 ^{cA}
C18:2n6c Linoleic Acid	9.75±0.00 ^{aB}	9.09±0.01 ^{dA}	9.27±0.01 ^{cB}	9.28±0.01 ^{bcC}	8.98±0.02 ^{eC}	9.23±0.00 ^{cB}	9.32±0.01 ^{bC}
C18:3n3 Alpha-Linolenic Acid	0.80±0.01 ^{dB}	0.67±0.00 ^{fB}	0.75±0.00 ^{cdA}	0.74±0.00 ^{dBbA}	0.70±0.00 ^{eB}	0.76±0.00 ^{bcB}	0.77±0.01 ^{bA}
T120							
C14:0 Myristic Acid	1.60±0.00 ^{aA}	1.44±0.01 ^{bC}	1.39±0.00 ^{cA}	1.43±0.01 ^{bA}	1.44±0.01 ^{bB}	1.46±0.01 ^{bB}	1.36±0.00 ^{cA}
C16:0 Palmitic Acid	25.89±0.03 ^{aA}	24.30±0.04 ^{dC}	24.58±0.04 ^{cA}	24.26±0.01 ^{dB}	24.87±0.13 ^{bAB}	23.51±0.00 ^{eC}	24.45±0.03 ^{cdB}
C16:1 Palmitoleic acid	2.26±0.00 ^{dC}	2.45±0.02 ^{ab^{cB}}	2.40±0.02 ^{cB}	2.49±0.02 ^{abB}	2.39±0.03 ^{cC}	2.52±0.00 ^{ab}	2.45±0.02 ^{bcA}
C18:0 Stearic Acid	14.74±0.00 ^{aA}	13.25±0.01 ^{dA}	13.53±0.01 ^{bcB}	13.26±0.00 ^{dA}	12.15±0.03 ^{fC}	12.79±0.00 ^{eC}	13.51±0.02 ^{cA}
C18:1n9c Oleic Acid	44.29±0.04 ^{eD}	48.36±0.07 ^{bA}	47.40±0.05 ^{dB}	48.37±0.02 ^{bC}	47.22±0.09 ^{dB}	50.41±0.00 ^{aA}	48.04±0.01 ^{cC}
C18:2n6c Linoleic Acid	10.40±0.00 ^{bA}	9.47±0.00 ^{dB}	9.94±0.01 ^{cA}	9.45±0.00 ^{dB}	11.19±0.04 ^{aA}	8.52±0.00 ^{eC}	9.45±0.02 ^{dB}
C18:3n3 Alpha-Linolenic Acid	0.83±0.01 ^{aA}	0.73±0.00 ^{dA}	0.77±0.01 ^{cA}	0.74±0.01 ^{dB}	0.75±0.00 ^{dA}	0.79±0.00 ^{bA}	0.75±0.00 ^{cdA}

F1 - traditional cultures without curing fat and curing salts reduction (nitrite and nitrate 0.015% 0.005%); F2 - traditional cultures without curing salts reduction; F3 – traditional cultures with curing salts reduction (nitrite and nitrate 0.007% 0.003%); F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salts reduction, respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salts reduction, respectively. T0 = initial time; T30 = end of the ripening period;

T120 = storage time at 4 ° C. Analysis of treatments: means with the same lowercase letters in the same line, in the same time interval, do not differ by Tukey test ($p < 0.05$).
Analysis of time: means with capital letters for the same formulation at different times, do not differ by Tukey test ($p < 0.05$).

For Peer Review

Table 5. Viability of probiotic microorganisms during the trial period.

	<i>Enterococcus</i> spp. (log UFC/g)		<i>Lactobacillus</i> spp. (log UFC/g)	
	F4	F5	F6	F7
T0	6.82 ^{aC} ±0.82	6.96 ^{aB} ±1.04	6.78 ^{bB} ±0.04	7.60 ^{aA} ±0.17
T7	8.09 ^{aAB} ±0.76	7.40 ^{aAB} ±0.53	8.37 ^{aA} ±0.54	7.63 ^{aA} ±0.76
T30	8.54 ^{aA} ±0.50	7.98 ^{aA} ±0.08	8.52 ^{aA} ±0.36	8.45 ^{aA} ±0.19
T60	7.44 ^{aABC} ±0.15	8.36 ^{aAB} ±0.54	8.36 ^{aA} ±0.54	7.83 ^{aA} ±0.47
T90	7.40 ^{aABC} ±0.19	7.63 ^{aAB} ±0.20	8.15 ^{aA} ±0.29	7.72 ^{aA} ±0.89
T120	7.15 ^{aABC} ±0.03	7.18 ^{aAB} ±0.27	7.73 ^{aA} ±0.09	7.35 ^{aA} ±0.43

F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salt reduction, respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salt reduction, respectively. T0 = initial time; T7 = end of the fermentation period; T30 = end of the ripening period; T60, T90 and T120 = storage time at 4 ° C. Means followed by the same lower case letters in a line and capital letters on the column do not differ from Tukey test (p<0,05).

Table 6. Means for population of potentially pathogenic microorganisms - microbiological safety.

		Positive coagulase staphylococci (log UFC/g)	Coliforms 45°C/ <i>E.coli</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>C.botulinum</i>
T0	F1	4.97 ^{aA} ±0.59	3.52 ^{aA} ±0.16	Absent	Absent	Absent
	F2	4.35 ^{aA} ±0.10	3.32 ^{aA} ±0.16	Absent	Absent	Absent
	F3	4.30 ^{aA} ±0.71	3.50 ^{aA} ±0.11	Absent	Absent	Absent
	F4	4.25 ^{aA} ±0.77	3.36 ^{aA} ±0.11	Absent	Absent	Absent
	F5	4.19 ^{aA} ±0.11	3.53 ^{aA} ±0.24	Absent	Absent	Absent
	F6	4.38 ^{aA} ±0.09	3.59 ^{aA} ±0.10	Absent	Absent	Absent
	F7	3.77 ^{bA} ±0.61	3.53 ^{aA} ±0.05	Absent	Absent	Absent
T7	F1	3.81 ^{aB} ±0.44	2.18 ^{aB} ±0.00	Absent	Absent	Absent
	F2	3.74 ^{aB} ±0.07	1.86 ^{aB} ±0.53	Absent	Absent	Absent
	F3	3.73 ^{aA} ±0.02	2.24 ^{aB} ±0.09	Absent	Absent	Absent
	F4	4.25 ^{aA} ±0.77	2.27 ^{aB} ±0.05	Absent	Absent	Absent
	F5	3.42 ^{aAB} ±0.54	2.35 ^{aB} ±0.07	Absent	Absent	Absent
	F6	3.76 ^{aB} ±0.05	2.27 ^{aB} ±0.01	Absent	Absent	Absent
	F7	3.34 ^{aA} ±0.40	2.07 ^{aB} ±0.16	Absent	Absent	Absent
T30	F1	3.59 ^{aB} ±0.12	< 1	Absent	Absent	Absent
	F2	3.68 ^{aB} ±0.19	< 1	Absent	Absent	Absent
	F3	3.70 ^{aA} ±0.01	< 1	Absent	Absent	Absent
	F4	3.69 ^{aA} ±0.06	< 1	Absent	Absent	Absent
	F5	3.45 ^{aAB} ±0.49	< 1	Absent	Absent	Absent
	F6	3.70 ^{aB} ±0.02	< 1	Absent	Absent	Absent
	F7	3.64 ^{aA} ±0.21	< 1	Absent	Absent	Absent

T60	F1	3.56 ^{aB} ±0.11	< 1	Absent	Absent	Absent
	F2	3.69 ^{aBC} ±0.32	< 1	Absent	Absent	Absent
	F3	3.69 ^{aA} ±0.07	< 1	Absent	Absent	Absent
	F4	3.68 ^{aA} ±0.03	< 1	Absent	Absent	Absent
	F5	3.01 ^{aAB} ±0.70	< 1	Absent	Absent	Absent
	F6	3.60 ^{aB} ±0.30	< 1	Absent	Absent	Absent
	F7	3.59 ^{aA} ±0.48	< 1	Absent	Absent	Absent
T90	F1	3.35 ^{aB} ±0.08	< 1	Absent	Absent	Absent
	F2	3.57 ^{aBC} ±0.33	< 1	Absent	Absent	Absent
	F3	3.66 ^{aA} ±0.08	< 1	Absent	Absent	Absent
	F4	3.59 ^{aA} ±0.20	< 1	Absent	Absent	Absent
	F5	3.29 ^{aAB} ±0.03	< 1	Absent	Absent	Absent
	F6	3.69 ^{aB} ±0.12	< 1	Absent	Absent	Absent
	F7	3.62 ^{aA} ±0.02	< 1	Absent	Absent	Absent
T120	F1	3.23 ^{aB} ±0.07	< 1	Absent	Absent	Absent
	F2	3.17 ^{aC} ±0.03	< 1	Absent	Absent	Absent
	F3	3.46 ^{aA} ±0.51	< 1	Absent	Absent	Absent
	F4	3.06 ^{aA} ±0.26	< 1	Absent	Absent	Absent
	F5	2.61 ^{bB} ±0.01	< 1	Absent	Absent	Absent
	F6	3.66 ^{aB} ±0.12	< 1	Absent	Absent	Absent
	F7	3.63 ^{aA} ±0.31	< 1	Absent	Absent	Absent

F1 - traditional cultures without curing fat and curing salt reduction (0.015% nitrite and 0.005% nitrate); F2 - traditional cultures without curing salt reduction; F3 – traditional cultures with curing salt reduction (0.007% nitrite and 0.003% nitrate); F4 and F5 - probiotic culture (*E. faecium* CRL183) without and with curing salt reduction, respectively; F6 and F7 - probiotic culture (*L. acidophilus* CRL1014) without and with curing salt reduction, respectively. T0 = initial time; T7 = end of the fermentation period; T30 = end of the ripening period; T60, T90 and T120 = storage time at 4 ° C. Means followed by the same lower case letters in a line and capital letters on the column do not differ from Tukey test (p<0,05).

For Peer Review