

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

VANESSA FELDMANN

AVALIAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS OBTIDAS A PARTIR DO KEFIR
COMO CULTURA INICIADORA PARA PRODUÇÃO DE EMBUTIDO CÁRNEO
FERMENTADO

Belo Horizonte – MG
2015

VANESSA FELDMANN

AVALIAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS OBTIDAS A PARTIR DO KEFIR
COMO CULTURA INICIADORA PARA PRODUÇÃO DE EMBUTIDO CÁRNEO
FERMENTADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências de Alimentos.

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientador: Dr. Afonso de Liguori Oliveira

Coorientadora: Dr^a. Roseane Batitucci Passos de Oliveira

Belo Horizonte - MG
2015

F312a Feldmann, Vanessa.
Avaliação de linhagens bacterianas obtidas a partir do kefir como cultura iniciadora para produção de embutido cárneo fermentado / Vanessa Feldmann. – 2015.
112 f. : il.

Orientador: Afonso de Liguori Oliveira
Co-orientadora: Roseane Batitucci Passos de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Embutidos – Análise – Teses. 2. Embutidos - Qualidade - Teses. 3. Bactérias produtoras de ácido láctico - Teses. 4. Leite fermentado – Teses. I. Oliveira, Afonso de Liguori. II. Oliveira, Roseane Batitucci Passos de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 664



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

VANESSA FELDMANN

**AVALIAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS OBTIDAS A PARTIR DO
KEFIR COMO CULTURA INICIADORA PARA PRODUÇÃO DE
EMBUTIDO CÁRNEO FERMENTADO**

TESE APROVADA EM 27 DE FEVEREIRO DE 2015

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. AFONSO DE LIGUORI OLIVEIRA
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. TADEU CHAVES DE FIGUEIREDO

Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES

Profa. Dra. ROSEANE BATITUCCI PASSOS DE OLIVEIRA
Coorientadora

*Dedico este trabalho ao meu marido,
Camilo Cienfuegos, meu amor eterno.*

AGRADECIMENTOS

A Deus a vida e a presença a iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, Mário Feldmann e Nilza Maria Camillo Feldmann, o amor, a dedicação e o ensinamento de que estudar nunca é tempo perdido.

À minha irmã, Renata Feldmann, a força e o discernimento ao tirar-me dos sonhos e colocar-me com os pés no chão. Suas palavras sempre cabem nas minhas decisões.

À minha irmã, Priscila Feldmann, as dicas em microbiologia, as placas de Petri descartáveis e a alegria por fazer-me a tia “Nena” de uma menininha tão preciosa em nossas vidas, Helena.

Ao meu marido, Camilo Cienfuegos, o amor, o carinho, o apoio e a admiração. Sua compreensão foi fundamental nessa trajetória, sem o seu apoio nada seria possível.

Aos meus avós, tios, primos, sogros e cunhados a vibração com as minhas conquistas.

Ao professor Afonso de Liguori Oliveira a dedicação, a paciência e a parceria.

À professora Roseane Batitucci Passos de Oliveira os ensinamentos e o acompanhamento sempre que precisei no laboratório de Microbiologia.

Ao professor Ivan Barbosa Machado Sampaio o auxílio e a disponibilidade nas análises estatísticas.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia a contribuição em minha formação acadêmica e a amizade.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG a colaboração nas análises físico-químicas. Em especial a Marco Antônio Guerra e Milton Luiz de Jesus.

Aos professores, funcionários e colegas do MICROAL e LAMIB da Faculdade de Farmácia da UFMG a importante participação nesse trabalho.

À minha amiga, Murielle Ferreira de Moraes, a amizade, a ajuda e a companhia. Você fez com que as madrugadas, os feriados e os fins de semana de trabalho ficassem mais leves e divertidos.

À Lígia Isoni Auad a troca de conhecimentos, a ajuda e os momentos de descontração.

Aos funcionários da Chácara Chiari André, Renato e Patrícia, em especial ao Sr. Carlos Eduardo Chiari a cessão da área industrial de processamento para elaboração dos produtos pelo tempo demandado à atividade, possibilitando que a parte fundamental do trabalho fosse ali realizada.

O auxílio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À “Gloriosa” ESALQ-USP a minha formação na graduação e na vida. As amigas e os ensinamentos me acompanharão para sempre onde eu estiver. Valeu República Quartel!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O salame é um embutido cárneo fermentado pela microbiota indígena ou culturas iniciadoras comerciais adicionadas, resultando em um produto com pH final entre 4,8 e 6,2, $A_w \leq 0,90$ sendo esse produto estável à temperatura ambiente. As culturas iniciadoras devem acidificar rapidamente a massa do produto, e contribuir para o desenvolvimento de características desejáveis ao salame. São comumente utilizadas como cultura iniciadora para produtos fermentados as bactérias lácticas, que apresentam rápida capacidade de acidificação, e compõe grande parte da microbiota presente em leites fermentados como o kefir, sendo composta por uma variedade de micro-organismos. Oito linhagens isoladas de kefir, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*, foram avaliadas quanto ao seu potencial como cultura iniciadora para um embutido cárneo fermentado. *Lactobacillus satsumensis* e *Leuconostoc mesenteroides* foram selecionados como cultura iniciadora por apresentarem os melhores resultados na capacidade de acidificação e crescimento *in vitro*, sendo então avaliados na elaboração de um salame. Foram elaborados 3 tratamentos de salames, sendo: SCO (Salame controle sem adição de cultura iniciadora), SCS (Salame adicionado com a cultura selecionada) e SCC (salame adicionado com a cultura comercial). Os tratamentos foram avaliados durante a fermentação, maturação e armazenamento. Foram efetuadas análises de pH, perda de peso, atividade de água, cor, textura, composição centesimal e microbiológicas. Entre os tratamentos, o SCC atingiu o pH 5,3 em menor tempo de fermentação, seguido do SCS. Entretanto, durante a maturação até o final do processo de secagem, o tratamento SCS manteve o menor valor de pH. Durante o armazenamento, o pH dos tratamentos SCS e SCC sofreram um leve aumento até o final de 30 dias. Os valores finais de perda de peso variaram entre 42,54% e 43,90%, enquanto todos os tratamentos alcançaram atividade de água abaixo de 0,90 ao final da maturação, mantendo-se após 30 dias de armazenamento. Os parâmetros L^* , a^* e b^* para cor, assim como a textura, variaram entre os tratamentos e ao longo do período de armazenamento. Os tratamentos também atenderam aos padrões de identidade, qualidade e microbiológicos para salame tipo italiano, fixados pela legislação brasileira, exceto para umidade, que apresentou valores um pouco acima do recomendado. A cultura iniciadora selecionada se mostrou promissora na fabricação de embutidos cárneos fermentados, como o salame tipo italiano.

Palavras-chave. bactérias lácticas, kefir, cultura iniciadora, embutido cárneo fermentado

ABSTRACT

The fermented sausage is a naturally or through of a starter culture fermented meat product, which has final pH between 4.8 and 6.2, and $A_w \leq 0.90$ and is stable at room temperature. Starter cultures must quickly acidify the mass and contribute to the development of product characteristics. Lactic acid bacteria are microorganisms commonly used as starter culture of fermented products for their acidification capacity. They also comprise a large part of the kefir microbiota, a dairy fermented drink composed by a variety of microorganisms. Strains of lactic acid bacteria isolated from kefir grains and identified by PCR, were evaluated for their potential to starter culture of fermented sausage. The eight strains used belong to *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Lactococcus*. *Lactobacillus satsumensis* and *Leuconostoc mesenteroides* were selected to be evaluated as starter culture of fermented sausage, because they had the best results in acidification capacity and growth *in vitro*. As fermented sausage, were prepared 3 treatments of typical italian salami: SCO (salami control without addition of starter culture), SCS (salami added to the selected culture) and SCC (salami added with the commercial culture). The treatments were evaluated during the fermentation, ripening and during storage process. Were made analyzes of microbiological, pH, weight loss, water activity, color, texture, and finally the chemical composition. Among the treatments, the SCC reached pH 5.3 in a shorter time fermentation, followed by the SCS. However, during the ripening until the end of the drying process, the SCS treatment maintained the lowest pH. During the storage, the pH of the SCS and SCC treatments experienced a slight increase by the end of 30 days. The final values of weight loss ranged between 42.54 and 43.90, while all treatments achieved water activity below 0.90 at the end of the process, remaining after 30 days of storage. The parameters L^* , a^* and b^* to color and texture ranged little between the treatments and during the storage period. The treatments also complied the standards of identity and quality and microbiological to typical italian salami, fixed by Brazilian legislation, except for the humidity parameter, which showed values slightly above recommended. The selected starter culture has shown considerable promise in the manufacture of fermented sausage like typical italian salami.

Keywords. lactic acid bacteria, kefir, starter culture, fermented sausage

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Principais micro-organismos utilizados como probióticos	24
Quadro 2 - Características estabelecidas para produtos denominados “salame tipo Italiano”	41
Quadro 3 - Padrão microbiológico para salames	41
Quadro 4 - Linhagens de bactérias lácticas (BAL) utilizadas neste estudo	45
Quadro 5 - Relação das matérias-primas utilizadas na elaboração do embutido cárneo fermentado.....	45
Quadro 6 - Formulação do Salame tipo italiano	48
Quadro 7 - Valores de pH dos meios de cultivo (MRS) das BAL em função do tempo de incubação.....	59
Quadro 8 - Médias das contagens de BAL (log UFC.mL ⁻¹) em caldo MRS em função do tempo de incubação a 37° C.....	62
Tabela 1 - Média (± desvios padrões) dos valores de pH nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de fermentação	67
Tabela 2 - Média (± desvios padrões) dos valores de pH nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de maturação.....	70
Tabela 3 - Média (± desvios padrões) dos valores de perda de peso (%) nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de fermentação e maturação.....	74
Tabela 4 - Média (± desvios padrões) dos valores de atividade de água (Aw) nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de fermentação e maturação.....	76
Tabela 5 - Média (±desvios padrões) dos valores de pH nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento	78
Tabela 6 - Média (±desvios padrões) dos valores de atividade de água (Aw) nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento	80
Tabela 7 - Média (± desvios padrões) dos valores de L* nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento	81
Tabela 8 - Média (± desvios padrões) dos valores de a* nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento	83
Tabela 9 - Média (± desvios padrões) dos valores de b* nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento	85
Tabela 10 - Média (±desvios padrões) dos valores da maciez objetiva (Kg) das amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento	87
Tabela 11 - Média (± desvios padrões) da composição centesimal nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento.....	90
Tabela 12 - Análises microbiológicas realizadas nas amostras de salame	92

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Reações químicas de formação da cor de embutido cárneo fermentado.....	39
Figura 2 - Contagem das colônias de BAL	477
Figura 3 - Etapas do processamento do salame tipo italiano.....	499
Figura 4 - Análise de pH durante a maturação	51
Figura 5 - Análise de determinação de atividade de água (A_w).....	51
Figura 6 - Determinação de maciez objetiva.....	52
Figura 7 - Determinação de cor	53
Figura 8 - Gráfico da capacidade de acidificação das BAL	60
Figura 9 - Gráficos das curvas de crescimento microbiano das BAL 23P3, 21U2 e 13U2	63
Figura 10 - Gráfico das curva de crescimento Microbiano das BAL 11P3, 17U e 3P.....	64
Figura 11 - Gráficos das curvas de crescimento microbiano das BAL 18P e 17P2.....	65
Figura 12 - Redução do pH durante a fermentação dos salames.....	68
Figura 13 - pH dos salames durante a fermentação e maturação	71
Figura 14 - Colonização de fungos na superfície dos salames tipo italiano ao longo do processo de maturação	72
Figura 15 - Perda de peso (%) dos salames de cada tratamento.....	75
Figura 16 - Atividade de água (A_w) durante a fermentação e maturação dos salames.....	77
Figura 17 - Evolução dos salames ao longo do período de armazenamento.....	86
Figura 18 - Salame tipo Italiano do tratamento SCS após 60 dias de armazenamento	87
Figura 19 - Proporção de proteínas, lipídeos, cinzas, cloretos e umidade da massa e do salame	89
Figura 20 - Prova de coagulase feita com plasma de coelho.....	92
Figura 21 - Amostras com suspeita de presença de <i>Salmonella</i> spp.	93
Figura 22 - Análise de <i>Salmonella</i> spp. em meio Rugai modificado.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIPECS: Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
ARDRA: Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado
AMI: American Meat Institute
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aw: Atividade de água
BAL: Bactérias Lácticas
B.O.D.: Câmara Bioquímica de Oxigênio
DTIPOA: Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
EFSA: European Food Safety Authority
FAFAR: Faculdade de Farmácia
FAO: Food and Agriculture Organization (Organização de Agricultura e Alimentação)
FDA: Food and Drug Administration
GRAS: Generally Recognized As Safe (Geralmente reconhecido como seguro)
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IDF: International Dairy Federation (Federação Internacional de Lácteos)
ISAPP: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos)
KABH: Kefir de Água de Belo Horizonte
KACU: Kefir de Água de Curitiba
KASA: Kefir de Água de Salvador
KAVI: Kefir de Água de Viçosa
KLCU: Kefir de Leite de Curitiba
KLDI: Kefir de Leite de Divinópolis
KLSA: Kefir de Leite de Salvador
KLVI: Kefir de Leite de Viçosa
LAB: Lactic acid bacteria (Bactérias lácticas)
LEFM: Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos
LGMPP: Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitas
LIA: Lysine Iron Agar (Ágar Ferro Lisina)
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
MICROAL: Laboratório de Microbiologia de Alimentos
MRS: Ágar Man, Rogosa e Sharpe
PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
QPS: Qualified Presumption of Safety
RTIQ: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
SCC: Salame adicionado com a cultura comercial
SCO: Salame controle sem adição de cultura iniciadora
SCS: Salame adicionado com a cultura selecionada
TSI: Triple Sugar Iron Agar (Ágar Tríplice Açúcar Ferro)
UFC: Unidades Formadoras de Colônias
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
WHO: World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Kefir	17
3.1.1 Características	18
3.1.2 Micro-organismos	19
3.1.2.1 Bactérias	20
3.1.2.2 Leveduras	20
3.1.3 Propriedades probióticas e antimicrobianas	21
3.1.4 Kefir de água	22
3.2 Bactérias lácticas	23
3.2.1 Efeitos probióticos e antimicrobianos das BAL.....	24
3.2.2 Aplicação das BAL em alimentos	26
3.2.3 Principais gêneros de BAL e suas aplicações.....	27
3.2.3.1 Gênero <i>Lactobacillus</i>	27
3.2.3.3 Gênero <i>Enterococcus</i>	29
3.2.3.4 Gênero <i>Streptococcus</i>	30
3.2.3.5 Gênero <i>Leuconostoc</i>	31
3.2.3.6 Gênero <i>Lactococcus</i>	32
3.3 Culturas iniciadoras	33
3.3.1 Culturas iniciadoras utilizadas em embutido cárneo fermentado	34
3.3.1.1 Bactérias lácticas (BAL)	34
3.3.1.2 Cocos coagulase negativa.....	36
3.4 Embutido cárneo fermentado	37
3.4.1 Salame	38
3.4.1.1 Processamento de salame	38
3.4.1.2 Ingredientes	40
3.4.1.3 Padrões de Identidade e Qualidade para Salame Tipo Italiano	41
3.4.1.3.1 Padrões físico-químicos	41
3.4.1.3.2 Padrões microbiológicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	44

4.1	Material.....	44
4.1.2	Matéria-prima e ingredientes do embutido cárneo fermentado.....	45
4.2	Métodos.....	46
4.2.1	Ativação e manutenção das culturas bacterianas.....	46
4.2.2	Seleção da linhagem de bactéria láctica como cultura iniciadora.....	46
4.2.2.1	Capacidade de acidificação.....	46
4.2.2.2	Curva de crescimento microbiano.....	47
4.2.3	Preparo da linhagem de bactéria láctica selecionada para aplicação no embutido cárneo fermentado.....	47
4.2.4	Elaboração do embutido cárneo fermentado.....	48
4.2.5	Avaliação dos tratamentos de salame tipo italiano.....	50
4.2.5.1	Análises físico-químicas.....	50
4.2.5.1.1	Avaliação do pH.....	50
4.2.5.1.2	Determinação da atividade de água (Aw).....	51
4.2.5.1.3	Avaliação da perda de peso.....	52
4.2.5.1.4	Determinação da maciez objetiva.....	52
4.2.5.1.5	Determinação de cor.....	53
4.2.5.2	Composição centesimal.....	53
4.2.5.2.1	Umidade.....	54
4.2.5.2.2	Determinação de lipídeos (método Soxhlet).....	54
4.2.5.2.3	Nitrogênio total e protédeos (método Kjeldahl).....	55
4.2.5.2.4	Resíduo mineral fixo (cinzas).....	55
4.2.5.2.5	Determinação de cloretos (método argentométrico).....	56
4.2.5.3	Avaliação microbiológica.....	56
4.2.5.3.1	Coliformes termotolerantes.....	57
4.2.5.3.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	57
4.2.5.3.3	<i>Salmonella</i> spp.	57
4.3	Delineamento experimental e análise estatística.....	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1	Seleção da linhagem de bactéria láctica como cultura iniciadora.....	59
5.1.1	Capacidade de acidificação.....	59

5.1.2	Curva de crescimento microbiano.....	62
5.2	Avaliação dos tratamentos de salame tipo italiano	66
5.2.1	Análises físico-químicas durante a fermentação e maturação.....	66
5.2.1.1	Avaliação do pH na fermentação	66
5.2.1.2	Avaliação do pH na maturação	70
5.2.1.3	Avaliação da perda de peso na fermentação e maturação	74
5.2.1.4	Determinação da atividade de água (Aw) na fermentação e maturação.....	76
5.2.2	Análises físico-químicas durante o armazenamento	78
5.2.2.1	Avaliação do pH no armazenamento.....	78
5.2.2.2	Determinação da atividade de água (Aw) no armazenamento	80
5.2.2.3	Determinação de cor.....	81
5.2.2.4	Determinação da maciez objetiva.....	87
5.2.2.5	Composição centesimal.....	89
5.2.3	Avaliação microbiológica.....	92
6.	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. INTRODUÇÃO

Kefir é a denominação dada a uma bebida fermentada obtida pela fermentação do leite por estruturas brancas amareladas, gelatinosas, denominadas grãos de kefir. Os grãos de kefir são formados por uma mistura complexa de micro-organismos, na qual bactérias lácticas (BAL) (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Streptococcus*), bactérias acéticas e leveduras formam com a caseína e açúcares complexos uma matriz de polissacarídeos.

As BAL necessitam de aminoácidos pré-formados, vitaminas do complexo B e bases purinas e pirimidinas para o crescimento. São mesófilas, entretanto, algumas crescem a temperaturas inferiores a 5°C e outras a temperaturas acima de 45°C. Seu metabolismo pode ser homofermentativo ou heterofermentativo e podem crescer em pH 3,2 e 9,6, sendo que a maioria cresce entre 4,0 e 4,5. Essas bactérias possuem pouca ação proteolítica e lipolítica. As BAL presentes no kefir têm potencial probiótico e são consideradas seguras (GRAS - Generally Recognized As Safe), podendo ser adicionadas em diversos tipos de produtos e alimentos.

A utilização de linhagens probióticas como culturas iniciadoras para fermentação de produtos à base de carne, requer que essas linhagens se adaptem às condições encontradas em produtos cárneos fermentados. A microbiota inicial presente na carne deverá ser suplantada pelas bactérias iniciadoras, que deverão crescer mais depressa do que os outros micro-organismos presentes.

Culturas iniciadoras são cultivos individuais ou mistos de micro-organismos selecionados para uma determinada atividade enzimática, adicionados em quantidade determinada para se obter a transformação específica desejada do substrato. As culturas iniciadoras destinadas à indústria de embutidos cárneos devem ser tolerantes ao sal e ao nitrito, devem crescer bem entre 27 e 30°C, como também em baixas temperaturas durante a maturação (10 a 15°C), não devem produzir sabores nem odores que não sejam característicos do produto e não podem ser prejudiciais à saúde.

Culturas iniciadoras devem acidificar rapidamente a matéria-prima por meio da produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, mas também produzem ácido acético, etanol, compostos aromáticos, bacteriocinas, exopolissacarídeos e várias enzimas. Em consequência, as culturas iniciadoras aumentam a vida de prateleira e a segurança microbiológica, melhoram a textura e contribuem para o perfil sensorial de produtos fermentados.

No Brasil, a população em geral possui o hábito de consumir diversos embutidos, dentre eles os salames. O salame é obtido a partir de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho e ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado. Os salames apresentam fungos, consequência natural do seu processo tecnológico de fabricação, possuem baixo valor de pH (4,8-6,2) e baixa atividade de água (A_w inferior a 0,90). Em geral, o produto deve atingir pH igual ou inferior a 5,3, ao final do período de fermentação. Com a secagem subsequente, deve ter sua atividade de água reduzida a valores inferiores a 0,90. Em função dessas características, as bactérias láticas encontram-se tecnologicamente aptas para serem utilizadas como culturas iniciadoras em salames, visto que apresentam viabilidade e crescimento mesmo em baixos valores de pH, na faixa de 3,9 a 4,5.

A disponibilidade no comércio de culturas iniciadoras comerciais para produtos cárneos fermentados é limitada, sendo que grande parte das indústrias brasileiras de embutidos cárneos ainda importam essas culturas. A seleção e a identificação de novas culturas iniciadoras para a fabricação de produtos cárneos fermentados representam um importante recurso tecnológico para as indústrias processadoras relevantes no país. Novas culturas iniciadoras contribuem para o desenvolvimento tecnológico de produtos fermentados e para a identificação da biodiversidade.

Diante dessas afirmações, o presente trabalho teve como proposta realizar uma seleção de BAL isoladas de kefir, e avaliar o potencial das mesmas como cultura iniciadora para salame.

2. OBJETIVOS

Selecionar a partir do kefir bactérias lácticas, identificando e avaliando seu potencial como culturas iniciadoras para aplicação em embutido cárneo fermentado.

2.1 Objetivos específicos

- I. Avaliar a capacidade de acidificação e velocidade de crescimento das linhagens de BAL isoladas de kefir;
- II. Acompanhar a variação das contagens das linhagens de BAL isoladas de kefir por até 24h;
- III. Selecionar dentre as linhagens de BAL isoladas de kefir as com perfil de cultura iniciadora para a fabricação de embutido cárneo fermentado;
- IV. Elaborar salames sem adição de cultura iniciadora (SCO), e com cultura iniciadora selecionada (SCS), e cultura iniciadora comercial (SCC);
- V. Determinar as características físico-químicas dos salames durante os períodos de fermentação, maturação e armazenamento;
- VI. Avaliar se os salames obtidos atendem aos padrões microbiológicos e de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Kefir

A palavra kefir é derivada da palavra turca *keif*, a qual significa “sentir-se bem”, sensação sentida após o seu consumo (LEITE *et al.*, 2013; LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006; TAMIME, 2006). O kefir é também conhecido como *Kefyr*, *Kephir*, *Kefer*, *Kiaphur*, *Knapon*, *Kepi* ou *Kippi* (FARNWORTH, 2005). A bebida kefir é originária das montanhas do Cáucaso, um produto tradicional de grande consumo na Europa Oriental, Rússia e sudoeste da Ásia (LEITE *et al.*, 2013; TAMIME, 2006). Antigamente, os grãos de kefir foram considerados um presente de Alá entre os muçulmanos e passados de geração em geração entre as tribos do Cáucaso, sendo estes considerados uma fonte de riqueza familiar (LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006). A fermentação do leite ocorria em sacos feitos do couro cru ou do estômago de animais. Adicionava-se o leite fresco ao leite fermentado e, após um tempo, ocorria um acúmulo de micro-organismos inseridos em um material com proteína e polissacarídeo, ocasionando a formação dos grãos (CARVALHO, 2011; REA *et al.*, 1996).

Nos últimos anos, houve o aumento do consumo de kefir em muitos países na América do Norte e oeste Europeu, por suas propriedades sensoriais únicas e associação do seu consumo a efeitos benéficos à saúde humana (FARNWORTH, 2005; LEITE *et al.*, 2013; TAMIME, 2006). Apesar de a bebida kefir ser encontrada em diversos países, no Brasil os grãos de kefir são encontrados no comércio, e são cultivados passando de pessoa para pessoa (LEITE *et al.*, 2013). No Brasil, o conhecimento sobre essa bebida, assim como os benefícios da inclusão de alimentos probióticos regularmente na dieta não está difundido, e a produção do kefir é exclusivamente artesanal (CARNEIRO, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Segundo a legislação brasileira vigente, o kefir, definido como leite fermentado, é um “produto resultante da fermentação de leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, cuja fermentação se realiza com cultivos acidolácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefiri*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono, sendo seus grãos constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnispurus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp.* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*” (BRASIL, 2007).

3.1.1 Características

Os grãos de kefir variam em tamanho de 0,3 a 2,0 cm ou mais de diâmetro, possuem uma superfície irregular, multilobular, e sua cor varia de branco para amarelo-claro. Os grãos são elásticos e possuem uma textura firme, com formato que lembra uma pequena couve-flor (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008; LEITE *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2011, TAMINE, 2006).

O kefir é caracterizado por possuir um sabor ligeiramente ácido, causado pelo acúmulo de ácido lático, refrescante, de consistência viscosa e carbonatada naturalmente devido à formação de CO₂ (FARNWORTH, 2005; GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2010; LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006, MAGALHÃES *et al.*, 2011). Os principais produtos da fermentação do kefir são o ácido acético, etanol e CO₂, que conferem a esta bebida viscosidade, acidez e baixo teor alcoólico. Outros componentes podem ser encontrados, incluindo diacetil, acetaldeído, ácidos aminados e etílicos, contribuindo para o sabor e aroma particular do produto (LEITE *et al.*, 2013; RATTRAY; O'CONNEL, 2011).

Essa bebida se difere de outros produtos fermentados por não ser resultado da atividade metabólica de apenas uma espécie de micro-organismo, mas sim de uma mistura de micro-organismos (GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2010). Os grãos de kefir são compostos de micro-organismos imobilizados em uma matriz constituída de proteína e polissacarídeo denominada kefirian, em que diversas espécies de bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras possuem interações mutuamente vantajosas, caracterizadas por simbiose (GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2010; LEITE *et al.*, 2013).

Os grãos de kefir desempenham o papel de fermento natural durante a produção e são recuperados após o processo de fermentação do leite (RATTRAY; O'CONNEL, 2011). Apesar de os grãos serem utilizados como fermento na produção de kefir tradicional, sua associação microbiológica complexa torna difícil a obtenção de uma cultura constante e definida, apropriada para a produção industrial de kefir, com a finalidade de manter suas propriedades convencionais (ROBINSON; TAMINE; WSZOLEK, 2002).

A composição físico-química do kefir varia conforme a matéria-prima, ou seja, o tipo de leite ou a água empregada na fermentação. Um kefir típico contém 89-90% de umidade, 0,2% de lipídios, 3,0% de proteína, 6,0% de carboidratos, 0,7% de cinzas e 1% de álcool e de ácido lático. O pH fica em torno de 4,0 e o teor alcoólico varia entre 0,5 e 2%. Estudos indicam que o kefir contém 1,98 g/L de dióxido de carbono, sendo que o conteúdo de

CO₂ aumenta conforme cresce a concentração de grãos de kefir (SARKAR, 2007). Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leites fermentados (BRASIL, 2007), a composição físico-química do kefir deve ser de no mínimo 2,9% de proteína, de 0,5 a 6,0% de gordura, menos de 1% de ácido láctico e de 0,5 a 1,5% de etanol.

3.1.2 Micro-organismos

O crescimento e a sobrevivência dos micro-organismos do grão de kefir dependem da presença de outros micro-organismos; por isso, os grãos de kefir são bons exemplos de simbiose (WITTHUHN; SHOEMAN; BRITZ, 2004). Os diversos micro-organismos se interagem garantindo a sua sobrevivência e propagação através da síntese de produtos que favorecem o crescimento, fornecem energia e inibem micro-organismos competidores, tais como agentes patogênicos de alimentos e contaminantes (GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2010; LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006). As leveduras produzem metabólitos essenciais para o crescimento das bactérias, tais como vitaminas, aminoácidos e outros compostos, promovendo a estabilidade do produto (VILJOEN, 2001).

As BAL são os micro-organismos predominantes e, dentre elas, os lactobacilos compõem a maior parte (80-90%), porém a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos, as técnicas usadas em sua manipulação e as formas de identificação dos micro-organismos são fatores que devem ser levados em consideração no estudo sobre a composição do kefir (KESMEN; KACMAZ, 2011; WITTHUHN; SHOEMAN; BRITZ, 2004). Durante o processo de fabricação do kefir, o tempo e temperatura de incubação, a quantidade de leite utilizada e as questões higiênicas sanitárias também interferem na microbiota do produto (ALTAY *et al.*, 2013).

No kefir, as BAL comumente encontradas são os lactobacilos, lactococos, leuconostoc e streptococos, responsáveis pela transformação da lactose presente no leite em ácido láctico como produto da fermentação, que resulta na redução do pH e preservação do leite. Há também leveduras fermentadoras de lactose, as quais produzem etanol e CO₂, leveduras não fermentadoras de lactose, e ainda, as bactérias acéticas (KESMEN; KACMAZ, 2011; LEITE *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2011).

Apesar de diversos fatores impactarem na composição da microbiota do kefir, geralmente encontra-se uma população de 10⁸-10⁹ UFC/g de BAL, 10⁵-10⁶ UFC/g de leveduras e 10⁵-10⁶ UFC/g de bactérias acéticas (FARNWORTH, 2005).

3.1.2.1 Bactérias

As BAL homofermentativas das espécies de *Lactobacillus* como: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* e *Lactobacillus acidophilus*; *Lactococcus* como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus thermophilus* têm sido identificadas nos grãos e na bebida fermentada de kefir, assim como as BAL heterofermentativas, incluindo *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus brevis*, e as linhagens citrato-positivas de *Lactococcus lactis* (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. O uso de citrato das linhagens citrato-positivas resulta na produção de compostos importantes que contribuem para o sabor típico de kefir (LEITE *et al.*, 2013).

As espécies de bactérias acéticas foram isoladas e identificadas nos grãos e na bebida de kefir em diversos trabalhos. A presença dessas espécies é considerada indesejável em alguns países e tem recebido menos atenção, mesmo que elas desempenham um papel fundamental tanto na microbiota quanto nas características sensoriais do produto final. Algumas pesquisas sugerem que a presença das bactérias acéticas está diretamente ligada à falta de higiene na produção da bebida. A produção de vitamina B₁₂ por essas bactérias estimula o crescimento de outras bactérias presentes no grão de kefir, além de serem responsáveis pela viscosidade da bebida juntamente com as bactérias lácticas (LEITE *et al.*, 2013; SARKAR, 2007; TAMIME, 2006).

3.1.2.2 Leveduras

As leveduras representam entre 10-17% da microbiota do kefir, sendo que as espécies lactose-negativas são a maioria. Essas espécies dependem das BAL para hidrolisarem a lactose, já que elas não possuem essa habilidade (SIMOVA *et al.*, 2002). As leveduras são fundamentais para o crescimento das bactérias no grão de kefir, mantendo a integridade e a viabilidade da sua microbiota. Elas produzem vitaminas, aminoácidos e metabólitos importantes para as propriedades sensoriais do kefir. As leveduras promovem a aceleração da fermentação e a produção do ácido lático pelas BAL e, posteriormente, o utilizam como fonte de energia.

São capazes de hidrolisar proteínas, utilizando o oxigênio para produção de CO₂ e etanol. As condições de acidez, a presença de CO₂ e o álcool inibem o crescimento da maioria das bactérias deteriorantes e de fungos filamentosos, estendendo a vida útil do produto e sua estabilidade (LEITE *et al.*, 2013; VARDJAN *et al.*, 2013, VILJOEN, 2001).

As principais leveduras capazes de fermentar lactose encontrada em kefir e em grãos de kefir são: *Kluyveromyces marxianus/Candida kefir*, *Kluyveromyces lactis* subsp. *lactis*, *Debaryomyces hansenii* e *Dekkera anomala*, enquanto as leveduras incapazes de fermentar lactose incluem: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* e *Debaryomyces occidentalis* (LEITE *et al.*, 2013) .

3.1.3 Propriedades probióticas e antimicrobianas

A composição química e microbiota do kefir o tornam um produto probiótico, isto é, os micro-organismos vivos presentes nesse alimento são capazes de garantir ou melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal, com consequente produção de efeitos benéficos à saúde do indivíduo (WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

Além de possuir alto valor nutricional como fonte de cálcio e proteína, o kefir é reconhecido por fazer bem à saúde em localidades onde ele faz parte da dieta. O kefir tem sido recomendado para o tratamento de diversas doenças gastrointestinais, hipertensão, alergias e doença cardíacas (LEITE *et al.*, 2013; VINDEROLA *et al.*, 2005). Outros benefícios à saúde têm sido atribuídos ao consumo do kefir, incluindo a melhoria do sistema imunológico, efeitos antimicrobianos, anti-inflamatório, antitumoral, antiviral, antimutagênico e atividade antioxidante (FARNWORTH, 2005; RODRIGUES *et al.*, 2005).

A ação de peptidases e proteinases, na hidrólise das proteínas do leite, resulta em um grande número de peptídeos com a possibilidade de serem peptídeos bioativos. Além dos peptídeos, durante a fermentação do kefir há a formação de outros compostos bioativos, como a formação de exopolissacarídeos, ácidos orgânicos, CO₂, peróxido de hidrogênio, etanol e bacteriocinas. Esses compostos podem ter efeitos benéficos agindo de maneira isolada ou concomitantemente (FARNWORTH, 2005; GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2010; LEITE *et al.*, 2013).

Os compostos produzidos durante a fermentação do kefir podem ter efeitos benéficos tanto no tratamento de doenças quanto para eliminar ou reduzir bactérias patogênicas e bactérias deteriorantes de alimentos e bebidas, durante a produção e armazenamento (FARNWORTH, 2005; SARKAR, 2007).

Carasi *et al.* (2014) isolaram e identificaram uma linhagem de *Enterococcus durans* a partir do kefir. Esta linhagem foi capaz de inibir diversos micro-organismos patogênicos, demonstrou ter propriedades anti-inflamatórias e ser uma linhagem com potencial probiótico para uso na indústria de alimentos.

No estudo de Rodrigues *et al.* (2005), os pesquisadores testaram a atividade antimicrobiana e cicatrizante do kefir e do kefiran contra espécies de bactérias e da *Candida albicans*. Ambos os produtos demonstraram atividade antagonista contra quase todos os micro-organismos testados, sendo que contra *Streptococcus pyogenes* foi mais efetivo. Enquanto em pele de animais tratados com 70% de gel de kefir apresentou melhor efeito protetor.

Vinderola *et al.* (2005) determinaram a capacidade imunomoduladora do kefir e do kefir pasteurizado na mucosa intestinal. Ambos obtiveram resultado positivo, apesar de ter sido demonstrado a importância da célula viável no resultado.

Por fim, linhagens de BAL isoladas de kefir foram avaliadas quanto a sua atividade inibitória contra linhagens de *Listeria monocytogenes*. Foi observada a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* por até 30 horas de incubação, concluindo que as linhagens de BAL isoladas de kefir são produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes* (AUAD, 2014).

3.1.4 Kefir de água

O kefir pode ser preparado em diversos tipos de leite, como o leite de vaca, ovelha, cabra, búfala e camelo. Além dos leites citados, também podem ser utilizados substitutos do leite, como o leite de soja, leite de arroz e o leite de coco para a produção da bebida (ALTAY *et al.*, 2013).

O kefir também pode ser produzido a partir de água e sacarose, adicionado de frutas secas ou figo e limão para dar sabor e ser fonte de mineirais. A composição microbiana é similar ao kefir de leite, sendo que há o predomínio das BAL e, em seguida, das leveduras e bactérias acéticas.

Assim como a microbiota, os metabólitos produzidos durante a fermentação são similares aos produzidos por grãos cultivados em leite (LAUREYS; DE VUYST, 2014; MARSH *et al.*, 2013). Enquanto os grãos são amarelo-claros quando cultivados em leite, apresentam aparência translúcida e parda quando cultivados em água (MARSH *et al.*, 2013).

No processo tradicional de preparação do kefir, os grãos de kefir são colocados em uma solução contendo aproximadamente 8% de sacarose, frutas secas e algumas fatias de limão. A fermentação ocorre em um ou dois dias à temperatura ambiente, resultando em uma bebida carbonatada, de coloração parda, ácida, pobre em açúcar e com pouco teor alcoólico (GULITZA, *et al.*, 2011).

3.2 Bactérias lácticas

As BAL são bactérias Gram-positivo, não produzem esporos, toleram ambiente ácido, quase sempre catalase negativas e anaeróbias facultativas. Essas bactérias são imóveis, com exceção das espécies *Lactobacillus satsumensis*, *Lactobacillus agilis* e das espécies *Lactobacillus ghanensis* e *Lactobacillus capillatus*, recentemente descritas. Em geral, são mesófilas, mas podem crescer em temperaturas abaixo de 5°C ou acima de 45°C. A maioria das linhagens cresce em pH 4 a 4,5, sendo que algumas podem crescer abaixo de 3,2, outras acima de 9,6. São pouco proteolíticas e lipolíticas e necessitam de aminoácidos pré-formados, purina, pirimidina e vitaminas do complexo B para seu crescimento (JAY, 2005, PATRICK, 2012).

As BAL pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e são compostas por 13 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Paralactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (JAY, 2005, PATRICK, 2012).

Há dois grupos de BAL divididos com base nos produtos finais do metabolismo da glicose. Um grupo, denominado homofermentativo, produz ácido láctico como único ou principal produto, enquanto o outro grupo, denominado heterofermentativo, produz etanol, CO₂ e lactato em quantidades equimolares a partir de hexoses. As culturas homofermentativas pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* e *Tetragenococcus* e algumas espécies de *Lactobacillus*. As bactérias heterofermentativas pertencem ao gênero *Paralactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*,

Carnobacterium e *Weissella*, incluindo algumas espécies de *Lactobacillus* (JAY, 2005; PATRICK, 2012).

3.2.1 Efeitos probióticos e antimicrobianos das BAL

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define probióticos como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2002). A recomendação para um alimento ser probiótico é estabelecida com base na porção diária de alimento, cujo mínimo estipulado seja de 10^8 a 10^9 UFC/g/dia (BRASIL, 2007).

Muitos micro-organismos são considerados probióticos, sendo que as BAL são os mais utilizados (FONTANA *et al.*, 2013; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). No Quadro 1, estão apresentados os principais micro-organismos utilizados como probióticos.

Quadro 1 - Principais micro-organismos utilizados como probióticos

Bactérias Ácido Láticas				Outras linhagens
<i>Lactobacillus</i>		<i>Bifidobacterium</i>	Outros gêneros	
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>Lb. Casei</i>	<i>Lb. gasseri</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lac. lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lb. crispatus</i>	<i>Lb. johnsonii</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>B. brevi</i>	<i>P. acidilactici</i>	
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>St. thermophilis</i>	
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. reuteri</i>	<i>B. lactis</i>	<i>St. diacetylactis</i>	
	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>St. intermedius</i>	
		<i>B. thermophilum</i>		

Fonte: SAAD *et al.*, 2013.

Para que o micro-organismo seja considerado probiótico, é necessário que tenha algumas características fundamentais. Os micro-organismos probióticos devem possuir a capacidade de sobreviver às condições gastrointestinais, incluindo a tolerância às amilases da boca, ao baixo pH estomacal causado pela secreção do suco gástrico e tolerância à bile e ao suco pancreático no intestino delgado (HERNADEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2012). Além dessas características, os probióticos devem ser capazes de se proliferarem e colonizarem o trato digestivo, serem seguros e eficazes e manterem-se viáveis durante a vida útil do produto (SAAD *et al.*, 2013). Por critério de segurança, os probióticos não podem apresentar patogenicidade, devem ser atóxicos e não causarem nenhum risco à saúde do hospedeiro (VASILJEVIC; SHAH, 2008)

Os probióticos têm se mostrado efetivos no tratamento e prevenção de diarreia, intolerância à lactose, doenças inflamatórias, colesterol, pressão alta, complicações no pós-operatório, síndrome do intestino irritado e câncer (FONTANA *et al.*, 2013; KECHAGIA *et al.*, 2013; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). No entanto, os mecanismos de ação desses micro-organismos ainda não estão completamente esclarecidos, e consistem em: competição por nutrientes e sítios de adesão, produção de metabólitos antimicrobianos, alteração das condições ambientais e modulação da resposta imune (SAAD *et al.*, 2013).

Um encontro de especialistas foi convocado pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP), no ano de 2013. Neste encontro, foi emitido um documento em consenso sobre o uso apropriado e a utilização do termo probiótico. Segundo a FAO/WHO (2001), os probióticos podem ser definidos como “microrganismos viáveis que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Infelizmente, o mau uso do termo probiótico se tornou uma questão importante, já que sua definição é ampla. Dentre as recomendações documentadas, as mais relevantes foram: incluir no quadro de definição de probióticos espécies microbianas que têm demonstrado, em estudos adequadamente controlados, que conferem benefícios à saúde; qualquer declaração de “contém probióticos” deve ser fundamentada; e manter culturas vivas, tradicionalmente associadas a alimentos fermentados e sem nenhuma evidência de um benefício à saúde, fora do quadro de probióticos (HILL *et al.*, 2014).

Atualmente, as propriedades antipatogênicas têm recebido maior atenção (JENSEN *et al.*, 2012). Os consumidores têm se preocupado com possíveis efeitos adversos à saúde decorrentes da presença de aditivos químicos em seus alimentos. Contudo, os consumidores são atraídos pelos alimentos naturais e sem conservantes químicos adicionados. Essa percepção, aliada ao aumento da demanda por alimentos minimamente processados com maior vida útil e conveniência, tem estimulado o interesse de pesquisas em encontrar conservantes naturais, porém eficazes. Bacteriocinas podem ser consideradas conservantes naturais ou bioconservantes que preenchem estes requisitos (CASTRO *et al.*, 2011).

Bacteriocinas são definidas como compostos protéicos produzidos por bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, que inibem ou destroem, através do efeito bacteriostático ou bactericida, espécies relacionadas (BESHKOVA; FRENGOVA, 2012; BROMBERG *et al.*, 2006).

Uma variedade de bacteriocinas é produzida por BAL presentes na microbiota da carne e de seus derivados, sendo estas ativas contra outras bactérias lácticas, bactérias deteriorantes e patogênicas. Este fato indica que as BAL são importantes bioprotetoras e podem elevar a segurança microbiológica e a vida útil dos alimentos, incluindo produtos cárneos fermentados (AMMOR; MAYO, 2007; CASTRO *et al.*, 2011).

3.2.2 Aplicação das BAL em alimentos

As BAL são encontradas em uma infinidade de nichos, incluindo material vegetal, leite fermentado, vegetais, carnes e pães fermentados. Alimentos fermentados por BAL possuem maior vida-de-prateleira, pois a fermentação melhora a textura, o sabor e o aroma desses produtos. Assim, uma variedade de BAL é utilizada como culturas iniciadoras para a produção de alimentos fermentados. Além dos alimentos fermentados, muitos alimentos funcionais são suplementados com BAL, pelas suas propriedades probióticas (EL GAISH *et al.*, 2011).

Entre os treze gêneros de BAL conhecidos somente *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactotoccus*, *Oenococcus*, *Streptococcus* e *Tetragenococcus* são usados diretamente na fermentação de alimentos. Os gêneros envolvidos na fermentação láctea são *Lactococcus* e *Streptococcus*, enquanto *Leuconostoc* e *Pediococcus* são indicados para a fermentação de vegetais, cereais e carne. *Tetragenococcus* é utilizado na fabricação de molho de soja, e *Oenococcus* na fermentação do vinho. *Lactobacillus* são utilizados em diversos produtos fermentados como leite, carne, vegetais e cereais (HUTKINS, 2006a).

Há uma grande gama de produtos contendo linhagens probióticas, e essa gama continua crescendo. Os principais produtos existentes no mercado são lácteos, incluindo leites fermentados, queijos, sorvete, manteiga, leite em pó e iogurtes. Outros produtos estão sendo desenvolvidos, como produtos à base de soja, barra de cereais, sucos, entre outros. Inovações tecnológicas atuais disponibilizam uma forma de superar a estabilidade e a viabilidade do probiótico. Através da microencapsulação, é possível proteger o micro-organismo pelos danos causados pelo processamento e o meio externo (KECHAGIA *et al.*, 2013).

3.2.3 Principais gêneros de BAL e suas aplicações

3.2.3.1 Gênero *Lactobacillus*

Este gênero compreende o maior número de espécies dentro do grupo das BAL. Tem sido encontrada na literatura científica dos últimos anos a descrição de novas espécies e subespécies. Possui morfologia heterogênea, apresentando-se na forma de cocobacilos ou bacilos e contém espécies que possuem metabolismo homofermentativo obrigatório, heterofermentativo facultativo e heterofermentativo obrigatório (HUTKINS, 2006a; STILLES; HOLZAPFEL, 1997).

Esse gênero está presente em plantas, vegetais, animais e nos alimentos, distribuído em todo o ambiente, sendo que inúmeras espécies são relevantes em alimentos fermentados. São Gram-positivo, mesófilas em sua maioria e possuem temperatura ótima de crescimento variando entre 30 e 45°C. Sobrevivem em ambiente ácido e são capazes de crescer em pH de até 7,2; algumas espécies são tolerantes ao sal, pressão osmótica, etanol, bile e à baixa atividade de água (HUTKINS, 2006a; STILLES; HOLZAPFEL, 1997).

Uma nova espécie inserida no gênero *Lactobacillus*, por Endo e Okada (2005) foi o *Lactobacillus satsumensis*, que isolaram o micro-organismo de uma bebida tradicional do Japão e encontraram características semelhantes às espécies *L. mali* e *L. nagelii*. A nova espécie foi descrita como bactéria lática na forma de bastonete, Gram-positivo, móvel, anaeróbia facultativa, catalase negativa e capaz de crescer em meio MRS contendo 5% de NaCl. Além disso, o metabolismo é homofermentativo, não reduz o nitrato e é capaz de crescer em temperaturas entre 15 e 45°C. Outra situação de constantes descobertas acerca deste gênero foi a reclassificação da linhagem *Lactobacillus ferintoshensis* (VANCANNEYT *et al.*, 2005). O estudo constatou que esta espécie é, na verdade, sinônima da *L. parabuchneri*, possuindo 99,7% de similaridade genética.

Este gênero vem se destacando também pelo seu potencial probiótico e pela produção de bacteriocinas como resultado do metabolismo da lactose. Algumas pesquisas apontam a importância dos *Lactobacillus* como produtores de bacteriocinas. Castro *et al.* (2011) identificaram e isolaram espécies de *L. sakei/curvatus*, e testaram sua atividade antimicrobiana frente a linhagens de *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* ou *Brochothrix spp.* Apesar de constatarem a influência dos aditivos na produção de bacteriocinas, as linhagens demonstraram possuir capacidade antimicrobiana.

Em outra pesquisa, também foi possível comprovar a atividade antagonista de diversas espécies de *Lactobacillus* frente a diferentes micro-organismos patogênicos. A atividade antagonista se deu não apenas através das bacteriocinas por elas produzidas, mas também pela presença da cultura e outros compostos antimicrobianos formados (HARTMANN; WILKE; ERDMANN, 2011). Inúmeras linhagens de *Lactobacillus plantarum*, produtores de bacteriocinas, foram isoladas de diferentes matérias-primas, nas últimas décadas, incluindo carne, peixe, vegetais, frutas, leite e cereais. Essas bacteriocinas podem reduzir/substituir o uso de conservantes químicos e melhorar a qualidade dos alimentos em geral (TODOROV, 2009).

Quanto ao potencial probiótico dos *Lactobacillus*, Jensen *et al.* (2012) selecionaram linhagens de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* para testes *in vitro*. Os testes consistiram na contagem de células viáveis após a simulação das condições do trato gastrointestinal. O estudo revelou que *L. reuteri* apresentou maior tolerância às condições gástricas e intestinais simuladas, além de demonstrar maior capacidade de adesão que as demais bactérias.

3.2.3.2 Gênero *Pediococcus*

O gênero *Pediococcus* foi mencionado, pela primeira vez, no ano de 1903, quando o pesquisador Claussen analisou uma cerveja deteriorada e descreveu a espécie *Pediococcus damnosus*. Este gênero é classificado como um organismo procarionte, pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* ou *Firmibacteria*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae*. Atualmente, são reconhecidas 15 espécies, sendo estas *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. cellicola*, *P. ethanolidurans*, *P. siamensis*, *P. claussenii*, *P. stilesii*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. dextrinicus*, *P. argentinicus*, *P. halophilus*, *P. lolli* e *P. urinaeequi* (EUZÉBY, 2015b; PFANNEBECKER, 2008).

A maioria das espécies de *Pediococcus* possui metabolismo homofermentativo, produzindo lactato como produto final, e apenas uma espécie heterofermentativa facultativa (FRANZ *et al.*, 2006). São bactérias Gram-positivo, anaeróbias facultativas ou microaerófilas, catalase negativa e oxidase negativa, cuja morfologia é esférica e organizam-se em tétrades, diferente das demais BAL que formam cadeias (HOLZAPFEL *et al.*, 2006).

A temperatura ótima de crescimento varia entre 25 e 45°C, suportam ambiente ácido e com alta concentração de sal. *Pediococcus* estão presentes naturalmente em plantas, vegetais crus, leite, urina de animais e na cerveja (HUTKINS, 2006a).

São importantes na fermentação de alimentos como chucrute, azeitona e cereais. Apesar de ser desejável na fermentação de diversos alimentos, *Pediococcus* pode causar a deterioração de algumas commodities e principalmente da cerveja (HOLZAPFEL *et al.*, 2006).

Essas bactérias também são produtoras de bacteriocinas. Fernandes *et al.* (2012) confirmaram o efeito antagonista da linhagem *Pediococcus acicilactici* UL5 contra *Listeria ivanovii* HBP 28 e associaram o efeito à bacteriocina produzida. Todorov e Dicks (2009) também identificaram uma linhagem de *Pediococcus pentosaceus* isolada de marula como produtora de bacteriocina. Ela apresentou atividade inibitória contra *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC19119 e *Enterococcus faecium* HKLHS.

3.2.3.3 Gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* é classificado como um organismo procarionte, pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* ou *Firmibacteria*, ordem *Lactobacillales* e família *Enterococcaceae*. Na atualidade, são descritas mais de 50 espécies e 2 subespécies (EUZÉBY, 2015c).

Enterococcus são bactérias Gram-positivo, catalase negativa, anaeróbias facultativas e apresentam-se na forma de cocos. Este micro-organismo é capaz de se multiplicar em meio contendo até 6,5% de NaCl, em pH de até 9,6 e a temperaturas entre 10 e 45°C, podendo sobreviver a 60°C. Este gênero tem como habitat natural o solo, plantas, água e o trato gastrintestinal de animais e do homem. São componentes da microbiota intestinal humana e de animais, agindo como micro-organismo patogênico em certas ocasiões e, frequentemente, apontado em casos de infecção hospitalar (DEVRIESE; BAELE; BUTAYE, 2006).

Poucos trabalhos são publicados em relação ao seu potencial probiótico, porém não há relatos de doenças causadas por linhagens probióticas deste gênero. As linhagens de *E. faecium* SF68 e *E. faecalis* Symbioflor vêm sendo estudadas por mais de 20 anos e são consideradas seguras para o tratamento de diarreia, diarreia associada a antibióticos, síndrome do intestino irritado, colesterol e para melhorar o sistema imune.

Entretanto, é importante a investigação das novas linhagens probióticas para se certificar de que não se trata de uma linhagem problemática, com perfil de virulência e resistência a antibióticos (FRANZ *et al.*, 2011).

Apesar de não ser reconhecido como um micro-organismo seguro (GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA), ele é desejável na fabricação de diversos tipos de queijo e em salame (FRANZ *et al.*, 2011). É comum a presença de *Enterococcus* em uma extensa variedade de queijos, proporcionando aroma e sabor diferenciados devido a sua atividade proteolítica e produtos formados pela heterofermentação (DEVRIESE; BAELE; BUTAYE, 2006). A desvantagem do uso dessa bactéria na produção de queijos e salame é pelo fato de ter a capacidade de produzir aminas biogênicas. Ogier e Serro (2008) sugeriram um estudo de cada caso do uso de linhagens de *Enterococcus* como cultura iniciadora em alimentos e como probióticos, para garantir a inocuidade e a ausência de fatores de virulência e resistência a antibióticos.

Moraes *et al.* (2012) apresentaram a caracterização molecular e fenotípica de *Enterococcus* isolados a partir de leite cru e de queijo, quanto ao seu potencial bacteriocinogênico e sua virulência. Os resultados foram controversos, já que as linhagens isoladas apresentaram potencial aplicação na preservação de alimentos, por produzirem bacteriocinas e fatores de virulência.

3.2.3.4 Gênero *Streptococcus*

Streptococcus é um organismo procarionte, pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* ou *Firmibacteria*, ordem *Lactobacillales* e família *Streptococcaceae*. Este gênero compreende mais de cem espécies, entre elas a *Streptococcus thermophilus* (EUZÉBY, 2015d).

São Gram-positivo, em forma de cocos, anaeróbias facultativas, imóveis e homofermentativas obrigatórias. São exigentes nutricionalmente e requerem carboidratos e proteínas. Muitas espécies são patogênicas, sendo que a espécie *Streptococcus thermophilus* é a única deste gênero relevante em alimentos. Esta linhagem é extremamente adaptada ao leite e fermenta a lactose rapidamente, além de suportar temperaturas de até 60°C (HUTKINS, 2006a; STILES; HOLZAPFEL, 1997).

O uso de *S. thermophilus* foi testado quanto ao seu potencial probiótico na prevenção de diarreia infantil associada ao uso de antibióticos. O estudo demonstrou eficácia

no tratamento oral, com uma fórmula comercial de probiótico contendo *S. thermophilus* e *Bifidobacterium lactis* (CORRÊA *et al.*, 2005). Outros estudos apontam o uso de algumas espécies de *Streptococcus* como sendo positivas na prevenção do mau-hálito, promoção da saúde bucal e na alimentação de tilápias (BURTON *et al.*, 2006, 2013; LARA-FLORES *et al.*, 2003).

3.2.3.5 Gênero *Leuconostoc*

Leuconostoc é classificado como um organismo procarionte, pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* ou *Firmibacteria*, ordem *Lactobacillales* e família *Leuconostocaceae*. A este grupo pertencem 23 espécies e 7 subespécies, entre elas *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc cremoris* e *Leuconostoc suionicum* (EUZÉBY, 2015e).

Essas bactérias são Gram-positivo, mesófilas, com crescimento ótimo entre 18 e 25°C, sendo que algumas espécies são capazes de crescer em temperaturas abaixo de 10°C. Apresentam-se na forma de cocos e, dependendo da composição do meio de crescimento, possuem forma de bastonete. Seu metabolismo é heterofermentativo, por isso não possui habilidade para acidificar intensamente o meio. Entretanto, ela desenvolve um ambiente propício para o desenvolvimento das bactérias homofermentativas, as quais possuem maior potencial de acidificação e são responsáveis pelo desenvolvimento do aroma e sabor do produto fermentado (HUTKINS, 2006a).

O seu habitat natural são as plantas, podendo ser encontrados no açúcar processado e em produtos lácteos fermentados (OGIER; SERRO, 2008). São importantes aliados na indústria de alimentos, pois participam da fermentação de vegetais, leite, queijo e pães (ZHU; ZHANG; LI, 2009). A espécie *Leuconostoc mesenteroides* pode ser utilizada em produtos cárneos, já que é capaz de reduzir o nitrito a óxido nítrico que, em combinação com a mioglobina da carne, forma o pigmento denominado nitrosomioglobina, desejável em produtos cárneos (OH; OH; KIM, 2004).

Assim como outras BAL, *Leuconostoc* também é produtor de bacteriocinas. Choi *et al.* (1999) isolaram *Leuconostoc sp.* J2 a partir de kimchi, um tradicional produto da culinária coreana. Esta linhagem produziu uma bacteriocina chamada leuconocina J, que foi capaz de inibir, pelo método de difusão em ágar, algumas bactérias lácticas e patogênicas.

Leuconostoc mesenteroides E131 também mostrou ser uma linhagem promissora na utilização como cultura protetora e produtora de bacteriocina em carnes fermentadas, visto que foi capaz de inibir *L. monocytogenes* nas condições de produção (DROSINOS *et al.*, 2005).

3.2.3.6 Gênero *Lactococcus*

Lactococcus é um organismo procarionte, pertencente ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* ou *Firmibacteria*, ordem *Lactobacillales* e família *Streptococcaceae*. Esse gênero atualmente é composto por nove espécies (*Lactococcus taiwanensis*, *Lactococcus chungangensis*, *Lactococcus fujiensis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactise*, *Lactococcus lactis* e *Lactococcus formosensis*) e quatro subespécies (EUZÉBY, 2015f).

São cocos Gram-positivo, imóveis, anaeróbios facultativos e homofermentativos, com temperatura ótima de crescimento de 30°C. Seu ambiente natural são as plantas e o leite (HUTKINS, 2006a). *Lactococcus lactis* é essencial na fabricação de produtos lácteos fermentados, em especial os queijos (NOMURA *et al.*, 2006). Essa espécie, além de ser importante na fabricação de fermentados lácteos, são produtoras da bacteriocina chamada nisina.

A nisina foi a primeira bacteriocina isolada de *Lactococcus lactis*, e é aprovada e utilizada em mais de 50 países como aditivo alimentar. O uso de suas bacteriocinas também ocorre no tratamento de mastite em vacas, e vêm sendo estudadas como um agente antipatogênico no tratamento de infecções gastrointestinais (ALEGRÍA *et al.*, 2010, BESHKOVA; FRENGOVA, 2012).

Bromberg *et al.* (2005) testaram uma bacteriocina produzida pela linhagem *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484, proveniente de frango, quanto a sua atividade antimicrobiana em carne bovina. A bacteriocina inibiu não apenas outra bactéria láctica (*Lactobacillus helveticus*); mas também, micro-organismos patogênicos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*), aumentando a vida útil do produto.

3.3 Culturas iniciadoras

No início, a produção de alimentos fermentados era através da fermentação espontânea, com a participação da microbiota naturalmente presente na matéria-prima e no ambiente. A fermentação espontânea foi melhorada através da inoculação da matéria-prima previamente fermentada com êxito (LEROY; De VUYST, 2004).

Segundo Ordóñez *et al.* (2005), culturas iniciadoras são cultivos individuais ou mistos de micro-organismos selecionados para determinada atividade enzimática, em quantidade específica para se obter a transformação desejada do substrato. Elas acidificam rapidamente a matéria-prima pela produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático, além de produzirem ácido acético, etanol, compostos aromáticos, bacteriocinas, exopolissacarídeos e várias enzimas (LEROY; De VUYST, 2004; LÜCKE, 2000). Dessa forma, as culturas iniciadoras contribuem para o aumento da vida-de-prateleira, segurança microbiológica, melhoram a textura e o perfil sensorial de produtos fermentados (LEROY; De VUYST, 2004).

Para a seleção de uma cultura iniciadora, devem ser levadas em consideração as características da matéria-prima, a formulação, as atividades metabólicas, a tecnologia aplicada e as características finais do produto. Os fatores ambientais também afetam o desenvolvimento da cultura iniciadora, como a temperatura, umidade relativa, pH, NaCl, quantidade de oxigênio, entre outros (BUCKENHÜSKES, 1993, LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006).

Embora as BAL sejam as bactérias mais importantes e utilizadas como cultura iniciadora, outras bactérias não lácticas também são utilizadas. Na indústria de queijo, a *Propionibacterium* subsp. *freudenreichii shermanii* é usada na fabricação do queijo emmental e queijo tipo suíço, enquanto a *Brevibacterium* é utilizada na produção de queijo Limburg e Munster (HUTKINS, 2006b).

Na Europa e, ocasionalmente, nos Estados Unidos, fabricantes de embutidos cárneos fermentados adicionam espécies de *Micrococcus spp.* Alguns fungos também são usados na fabricação de queijos, como *Penicillium roquefort*, na fabricação de queijo roquefort, e *Penicillium camemberti*, na fabricação de queijo camembert. Para a fabricação de *tempeh* e molho de soja são utilizadas as espécies de fungos *Rhizopus microsporus* subsp. *oligosporus*, *Aspergillus sojae* e *Aspergillus oryzae*.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são importantes culturas iniciadoras de pães, vinhos, cervejas e bebidas destiladas (HUTKINS, 2006b).

O uso de culturas iniciadoras com microbiota funcional vem ganhando importância e sendo mais exploradas pelas indústrias de alimentos. Além de contribuir para o processo de fermentação, essas culturas proporcionam propriedades funcionais, oferecendo maior segurança microbiológica, nutricional e benefícios à saúde (AMMOR; MAYO, 2007; LEROY; DE VUYST, 2004).

3.3.1 Culturas iniciadoras utilizadas em embutido cárneo fermentado

A fermentação espontânea de produtos cárneos envolve a participação das BAL, cocos coagulase negativo e catalase positivo da família *Micrococcaceae* (*Staphylococcus* e *Kocuria*) e, com menor relevância, leveduras (*Debaryomyces*) e bolores (*Penicillium*). A grande maioria das culturas iniciadoras comerciais utilizadas em produtos cárneos contém uma mistura dessas bactérias (AMOR; MAYO, 2007; LÜCKE, 2000).

As culturas iniciadoras adicionadas em embutidos cárneos podem reduzir os custos de produção, por causa da redução no tempo de fermentação e maturação, melhorar o controle microbiológico e padronizar o processo e o produto, estendendo sua vida de prateleira (LÜCKE, 2000).

As culturas iniciadoras destinadas à indústria de embutidos cárneos devem ser tolerantes ao sal e ao nitrito; devem crescer bem entre 27 e 30°C; mas também, em baixas temperaturas durante a maturação; não devem produzir sabores nem odores que não sejam característicos do produto; não podem ser prejudiciais à saúde; e não devem descarboxilar os aminoácidos reduzindo a formação de aminas biogênicas (GLORIA, 2005; ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

3.3.1.1 Bactérias lácticas (BAL)

Lactobacillus sakei, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Pediococcus acidilactici* são espécies comumente isoladas de salame e as mais utilizadas como culturas comerciais. BAL isoladas da própria carne são mais adaptadas ao ambiente e podem ter melhor competitividade perante outros micro-organismos, impedindo o desenvolvimento de

propriedades sensoriais indesejáveis no produto final (HUGAS; MONFORT, 1997; AMOR; MAYO, 2007).

As BAL são responsáveis pelo acúmulo de ácido lático nos salames, através do metabolismo do carboidrato, diminuindo o pH do produto e fazendo com que as proteínas se aproximem do ponto isoelétrico. O acúmulo de ácido lático coagula as proteínas solúveis da carne, reduz sua capacidade de retenção de água e favorece o processo de maturação, resultando em melhor fatiabilidade, firmeza e coesividade (HUGAS; MONFORT, 1997; LÜCKE, 2000; RUIZ, 2011).

A acidificação do produto cárneo pode ser alcançada através da adição de glucona-delta lactona; contudo, o sabor e o aroma originais são obtidos pela fermentação (BUCKENHÜSKES, 1993). O sabor ácido do salame é desenvolvido pelas bactérias lácticas, além de outros compostos que favorecem o sabor e aroma produzidos pela atividade proteolítica e lipolítica, que não ocorre em excesso, no entanto, foi observada em algumas linhagens de BAL presentes na carne (LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006). A degradação das proteínas ocorre durante a fermentação e maturação do embutido cárneo, e pode ser atribuída à ação sinérgica das proteases da carne e da atividade proteolítica das BAL e de outras bactérias, induzidas pela acidificação da carne alcançada durante a fermentação (FADDA; LÓPEZ; VIGNOLO, 2010).

O desenvolvimento da cor também ocorre em condições ácidas, quando o óxido nítrico é produzido através da redução do nitrito e pode reagir com a mioglobina formando o composto nitrosomioglobina, pigmento responsável pela cor vermelha do embutido. Estudos apontam que algumas bactérias lácticas envolvidas na fermentação de embutido cárneo possuem atividade catalase, nitrato e nitrito redutase (HAMES, 2012; HUGAS; MONFORT, 1997).

As bactérias heterofermentativas podem produzir grande quantidade de dióxido de carbono, causando defeitos na textura e fatiabilidade do produto; porém, também podem inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, através da redução do potencial redox, criando um ambiente favorável ao crescimento das bactérias que acidificam o meio (BUCKENHÜSKES, 1993; HUTKINS, 2006b). Além da produção de gás, essas bactérias produzem ácido acético como produto da fermentação em quantidades que causam o indesejável sabor de vinagre (AMMOR; MAYO, 2007).

O uso de bactérias lácticas como cultura iniciadora pode causar a formação de peróxidos de hidrogênio. A maioria das BAL é capaz de produzir peróxido de hidrogênio pela

reação de oxidação do lactato. O peróxido de hidrogênio pode agir de forma positiva em certos alimentos, resultando na inibição de micro-organismos indesejáveis. Entretanto, em produtos cárneos, esses compostos geram defeitos na coloração, visto que essas substâncias atacam os hemepigmentos (BUCKENHÜSKES, 1993).

Finalmente, as bactérias deterioradoras e patogênicas são inibidas através do acúmulo de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, enzimas e bacteriocinas produzidas pelas BAL (HAMES, 2012; HUGAS; MONFORT, 1997).

3.3.1.2 Cocos coagulase negativa

Assim como as BAL, *Staphylococcus* coagulase negativa estão presentes na microbiota natural da carne e de embutidos cárneos fermentados. *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. saprophyticus* e *Kocuria varians* são as espécies mais frequentemente utilizadas como cultura iniciadora comercial, no processamento de embutido cárneo fermentado. A principal função dessas bactérias, no processamento de embutido cárneo fermentado, é a redução do nitrato a nitrito e, posteriormente, a óxido nítrico, já que possuem alta atividade nitrato redutase (BONOMO *et al.*, 2009, CASABURI *et al.*, 2005; RUIZ, 2011).

Além de possuírem atividade nitrato redutase, esses micro-organismos contribuem para o desenvolvimento das qualidades organolépticas dos produtos fermentados durante a maturação, através das atividades das enzimas catalase, proteases e lipases (HUTKINS, 2006b; LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006). Essas enzimas são importantes no desenvolvimento de cor, aroma e sabor, na inibição de patógenos e na degradação de peróxido de hidrogênio (HAMES, 2012). O peróxido de hidrogênio, comumente produzido pelas BAL, pode ser degradado por esses micro-organismos por serem catalase positivo, reduzindo o risco de oxidação lipídica e defeitos na coloração, aroma e sabor do produto (HUTKINS, 2006b).

Apesar de *Staphylococcus* ser largamente utilizado como cultura iniciadora de carnes fermentadas, não é reconhecida como segura (Qualified Presumption of Safety) pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA). São necessários estudos sobre toxicidade e patogenicidade, assim como ocorre a resistência a antibióticos (HAMES, 2012).

É importante ressaltar que esse grupo é de bactérias não fermentativas, ou seja, não produzem ácido láctico como produto final, sendo necessário o uso concomitante de BAL na fabricação de embutido cárneo fermentado (CASABURI *et al.*, 2008).

3.4 Embutido cárneo fermentado

A composição da carne a torna extremamente vulnerável à deterioração microbiana. Ela é um substrato rico em nutrientes, com elevada A_w e pH entre 5,6 e 5,8. A carne é considerada um componente essencial na dieta humana, por favorecer o crescimento e o desenvolvimento. O seu consumo está ligado a fatores socioeconômicos, étnicos ou religiosos e tradição. A carne contém uma variedade de nutrientes que estão presentes tanto na sua forma fresca quanto na carne processada (FONTI-I-FURNOLS; GERRERO, 2014; HAMES; HALLER; GÄNZLE, 2006).

Com a finalidade de preservar a carne certas práticas foram adotadas, como o uso de especiarias, sal, o cozimento, o processo de secagem e fermentação. Essas práticas aumentavam a vida útil do produto mesmo em temperatura ambiente (HUTKINS, 2006c). A fabricação dos embutidos cárneos fermentados originou-se na Europa, próximo ao Mar Mediterrâneo, durante a Era Romana. A tecnologia da fermentação da carne era considerada uma arte, realizada por artesão, monges e especialistas (HUTKINS, 2006c).

O processo de fermentação da carne transforma um produto perecível em um produto estável e seguro, com alto valor nutritivo e qualidades sensoriais elevadas (HAMES; HALLER; GÄNZLE, 2008). Atualmente, com o desenvolvimento de tecnologia no processo de preservação da carne, há uma grande variedade de produtos cárneos fermentados, classificados de acordo com a origem, matéria-prima utilizada, o processo de secagem e defumação (HUTKINS, 2006c).

Na Europa, a produção e o consumo de produtos cárneos fermentados são bastante elevados, sendo que mais de 600 milhões de quilos são consumidos apenas na Alemanha, Itália, Espanha e França. Cerca de 3-5% de toda carne consumida nesses países ocorrem na forma de embutido cárneo fermentado (HAMES; HALLER; GÄNZLE, 2008; HUTKINS, 2006c).

No Brasil, a fabricação de embutidos cárneos fermentados iniciou-se com a colonização de imigrantes italianos e alemães, principalmente na região sul do país, onde as condições climáticas propiciaram a produção caseira que, com o passar do tempo, deu origem às pequenas fábricas (CIROLINI, 2008). Segundo o último relatório da Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPECS, 2013), em 2012, o Brasil foi o terceiro maior produtor de carne suína no mundo e o quarto maior exportador. O mercado

interno tem maior preferência pelos produtos processados, sendo que do total das aquisições domiciliares de carne suína em 2009, 2% foram de salame (ABICEPS, 2010).

3.4.1 Salame

A legislação brasileira define o salame como um “produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado”, e, ainda, podem apresentar "mofos" característicos, que é consequência natural do seu processo tecnológico de fabricação (BRASIL, 2000).

3.4.1.1 Processamento de salame

O processo de fabricação do salame consiste basicamente de 3 etapas: elaboração do salame, fermentação e maturação (HUTKINS, 2006c).

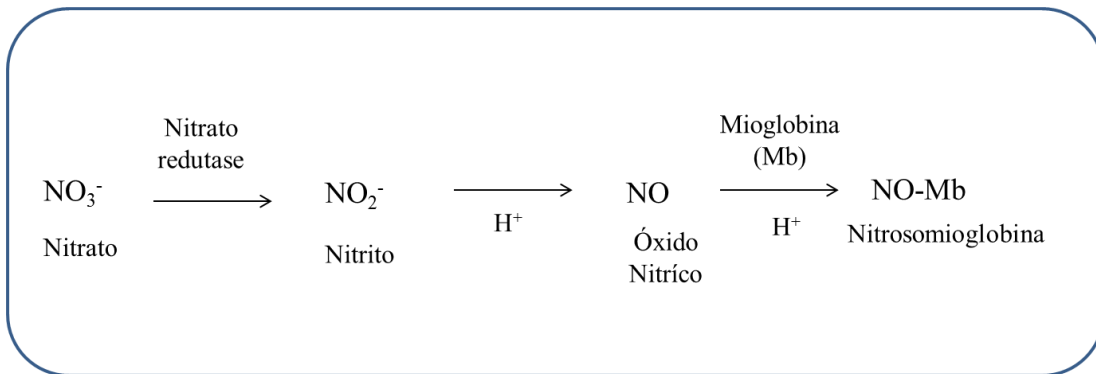
A elaboração do salame ocorre por meio da seleção dos ingredientes, pesagem, mistura e embutimento da massa. Os ingredientes comumente adicionados são a carne suína, carne bovina, toucinho, sal de cura, nitrato, ácido ascórbico e especiarias. O carboidrato (glicose, sacarose e maltodextrina) também deve ser parte dos ingredientes para servir como substrato para a fermentação realizada pelas BAL (HAMES; HALLER; GÄNZLE, 2008; HOLCK *et al.*, 2011). A cultura iniciadora adicionada pode ser composta de uma única espécie de BAL ou uma mistura de bactérias. A mistura dos ingredientes é embutida em tripa e submetida ao processo de fermentação.

Durante a fermentação e maturação do salame, reações bioquímicas e físicas ocorrem e resultam em uma mudança significativa das características iniciais. Estas mudanças podem ser resumidas do seguinte modo: diminuição do pH, mudanças da microbiota inicial, redução de nitrato a nitrito com a formação de nitrosomioglobina, solubilização e geleificação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, proteólise, lipólise, fenômenos oxidativos e desidratação. Essas reações acarretam o desenvolvimento da cor vermelha, formação de sabor e aroma característicos, desenvolvimento de textura e fatiabilidade, inibição de microorganismos patogênicos e deterioradores e aumento da vida de prateleira (BUCKENHÜSKES, 1993; CASABURI *et al.*, 2007).

A fase de fermentação deve ser conduzida em condições adequadas, com temperatura e umidade controladas, facilitando o desenvolvimento das BAL. As BAL são responsáveis pela fermentação do carboidrato, resultando em ácido lático, ácido acético em menor quantidade e alguns voláteis (HOLCK *et al.*, 2011; LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006). O ácido lático produzido durante a fermentação leva a uma redução do pH. Em geral, o salame deve atingir pH igual ou inferior a 5,3, no final do período de fermentação (HOLCK *et al.*, 2011). A redução do pH leva a estabilidade e segurança do salame, já que está relacionado com a redução do tempo de secagem e torna o ambiente ácido (HOLCK *et al.*, 2011). Durante essa etapa, as proteases da carne são responsáveis pela proteólise e formação de peptídeos, importantes na formação de aroma e sabor (LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006).

A maturação tem como propósito desenvolver qualidades sensoriais (cor, sabor, aroma e textura) e proporcionar a secagem (HUTKINS, 2006c). Nesta etapa, os salames devem atingir baixa atividade de água ($\leq 0,9$) e sua umidade fica em torno de 25-40%, proporcionando a textura característica do produto (HOLCK *et al.*, 2011, KIM *et al.*, 2012). Compostos aromáticos são desenvolvidos pelas culturas iniciadoras durante a maturação, a partir da conversão de peptídeos gerados pela proteólise muscular na fermentação em aminoácidos. Além disso, a lipólise desempenha papel fundamental no desenvolvimento de aroma e sabor através da liberação de ácidos graxos (LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006). O desenvolvimento da cor ocorre de forma gradativa principalmente durante a maturação do embutido cárneo fermentado, quando ocorre a redução do nitrato e nitrito à nitrosomioglobina, pigmento responsável pela cor vermelha do embutido (Figura 1).

Figura 1 – Reações químicas de formação da cor de embutido cárneo fermentado



Fonte: HUTKINS, 2006c.

Ao final do processamento, os salames têm baixo valor de pH (4,8-6,2) e baixa atividade de água ($\leq 0,9$) (HOLCK *et al.*, 2011, KIM *et al.*, 2012). Baseado nessas características, as bactérias lácticas são tecnologicamente aptas a serem utilizadas como culturas iniciadoras de salame, visto que apresentam viabilidade e crescimento mesmo em baixos valores de pH, na faixa de 4,5 a 3,9 (CARNEIRO, 2010; CARVALHO, 2011).

3.4.1.2 Ingredientes

O salame tipo italiano deve ter como ingredientes obrigatórios no mínimo 60% de carne suína, toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio. Outros ingredientes como carne bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas, aditivos intencionais, vinho, condimentos, aromas e especiarias e substâncias glaceantes são permitidos. As culturas iniciadoras entram como coadjuvantes de tecnologia e foram detalhadas anteriormente (BRASIL, 2000).

A carne é obviamente o ingrediente mais importante na fabricação de um embutido cárneo fermentado. Além de ser a matriz proteica, fornece também a gordura, que pode ser retirada de um corte diferente ou até mesmo de outro animal. O carboidrato é comumente adicionado, uma vez que a quantidade de ácido lático produzido pela cultura iniciadora está diretamente relacionada com a quantidade de açúcar disponível. Além disso, níveis elevados de açúcar, promovem rápida fermentação (HUTKINS, 2006c).

O sal (NaCl) é um dos conservantes mais antigos na utilização para preservação dos alimentos. É indispensável nos embutidos cárneos de todos os tipos, e é adicionado em concentração de até 3%. O sal é responsável pela extração e solubilização das proteínas musculares, formando uma consistência de gel e criando a emulsão. Além disso, o sal proporciona sabor e ajuda a controlar a microbiota e inibir diversos micro-organismos indesejáveis. É importante a escolha de uma cultura iniciadora resistente à quantidade de NaCl utilizada no processamento do embutido (HOLCK *et al.*, 2011; HUTKINS, 2006c).

O nitrito e o nitrato estão incluídos nos sais de cura e são frequentemente utilizados. Estão presentes juntamente com o sódio ou o potássio. Esses ingredientes agem contra bactérias indesejáveis, principalmente o *Clostridium botulinum*, que desenvolvem a toxina botulínica. O nitrito, normalmente utilizado em combinação com o ascorbato, desenvolve a cor e sabor típico de curado, além de agir como antioxidante. Em pH baixo, aumenta a atividade antimicrobiana, pois se encontra na forma de NaNO_2 (HAMES, 2012;

HOLCK *et al.*, 2011). No Brasil, a legislação estabelece um limite máximo residual de nitrito de 30 mg . Kg⁻¹ de produto por razões toxicológicas (BRASIL, 2000; HAMES, 2012).

O ascorbato e o eritorbato são utilizados como agentes antioxidantes, auxiliando na fixação da cor e do sabor e aroma dos salames. Outros ingredientes ainda podem ser adicionados com o intuito de promover e realçar aromas e sabores aos embutidos (HUTKINS, 2006c).

3.4.1.3 Padrões de Identidade e Qualidade para Salame Tipo Italiano

3.4.1.3.1 Padrões físico-químicos

A Instrução Normativa Nº 22 de 31 de julho de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), alterada pela Instrução Normativa Nº 55 de 07 de julho de 2003, fixa a identidade e estabelece as características mínimas de qualidade para os diferentes tipos de salames elaborados no Brasil (Quadro 2).

Quadro 2 - Características estabelecidas para produtos denominados “salame tipo Italiano”

Parâmetros	Salame Tipo Italiano
Atividade de água (Aw)	Máximo 0,90
Umidade	Máximo 35%
Gordura	Máximo 32%
Proteína	Mínimo 25%
Carboidratos Totais	Máximo 4%

Fonte: BRASIL, 2000, 2003.

3.4.1.3.2 Padrões microbiológicos

Os padrões microbiológicos do salame são regulamentados através da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). No Quadro 3, estão mencionados os micro-organismos e o limite de contagem permitido pela legislação brasileira para salame.

Quadro 3 - Padrão microbiológico para salames

Micro-organismo	Tolerância (UFC/g)
Coliformes a 45°C	10 ³
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	5 x 10 ³
<i>Salmonella spp.</i>	Ausência/25g

Fonte: BRASIL, 2001.

Durante a preparação do embutido cárneo fermentado, alguns fatores como a qualidade da matéria-prima, o pH e a temperatura inadequada durante o processo influenciam na contaminação e no crescimento de micro-organismos indesejáveis. Os coliformes termotolerantes são facilmente encontrados em salame. Essas bactérias fazem parte da microbiota intestinal do homem e dos animais e sua presença é um indicador de contaminação fecal. Produtos elaborados com carne de porco representam um grande risco de contaminação por *Escherichia coli*, o que gera um problema de saúde pública, causando colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombocitopênica trombótica (DIAS *et al.*, 2011, RODE *et al.*, 2012).

Os salames são produtos prontos para o consumo, não cozidos previamente. A manipulação inadequada desse produto pode ser a causa de contaminações por *Staphylococcus coagulase positiva*. *Staphylococcus coagulase positiva* também representa um risco à saúde do consumidor quando presente em alta quantidade. *S. aureus* é a espécie mais associada a surtos de intoxicação alimentar. Essa bactéria é capaz de crescer na temperatura de fermentação e em condições anaeróbias, além de tolerar sal e nitrito. Esse micro-organismo produz uma enterotoxina que ao ser ingerida pode causar náuseas, vômito e mal-estar (BORGES *et al.*, 2008; KABAN; KAYA, 2006). *S. aureus* está presente no ambiente, nariz, face, pele e nas mãos do homem. A dose infectante mínima em um alimento para que se tenha a formação da enterotoxina está entre 10^5 e 10^6 UFC/g de produto (GIRMA; KETEMA; BACHA, 2014).

Também foi relatada a produção de enterotoxinas por espécies de *Staphylococcus coagulase negativa*, mostrando que esses micro-organismos podem oferecer riscos à saúde do consumidor apesar do baixo potencial toxigênico e enterotoxigênico (BORGES *et al.*, 2008; TALON; LEROY, 2011). Em embutidos cárneos fermentados, a população de *Staphylococcus coagulase negativa* pode variar entre 5 e 7 log de UFC/g, sendo que as espécies *S. xylosus* e *S. equorum*, encontradas nesses produtos, já foram relatadas em casos de infecções que não envolviam o consumo de alimentos (TALON; LEROY, 2011).

Por fim, *Salmonella* spp. é uma bactéria entérica causadora de doenças gastrointestinais cujos sintomas são dores abdominais, febre e diarreia. A salmonelose pode estar associada ao consumo de carne, principalmente de aves e suína, ovos, leite e alimentos que tiveram contato com fezes de animais contaminados através da contaminação cruzada. (GIRMA; KETEMA; BACHA, 2014; HOSPITAL; HIERRO; FERNÁNDEZ, 2014).

O risco de conter *Salmonella* spp. em salame é por sua habilidade em crescer em ambiente com A_w inferior a 0,94 e pH acima de 4,0. No Brasil e em diversos países a legislação não permite a presença dessa bactéria em 25g de produto (BRASIL, 2001; DUCIC *et al.*, 2014).

Por causa da combinação de obstáculos, tais como baixo pH e baixa atividade de água, os embutidos cárneos fermentados são tradicionalmente considerados seguros (HOLCK *et al.*, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICROAL) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia (FAFAR) e no Laboratório de Físico-Química II do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária, ambos pertencentes à Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os salames foram processados na Salumeria Chiari, localizada no município de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais.

4.1 Material

4.1.1 Linhagens de bactérias lácticas

Foram utilizadas oito linhagens de bactérias lácticas isoladas de grãos de kefir de água ou leite por Zaniratti (2012). Resumidamente, a identificação dos isolados do grão de Kefir, foi obtida através da associação dos métodos dependente e independente de cultivo em laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

No Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM), foi feita a identificação preliminar morfológica através da coloração de Gram e teste de catalase. Em seguida, os isolados dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Oenococcus* foram submetidos à identificação por PCR-ARDRA (Reação em Cadeia de Polimerase-Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado), no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários e Parasitas (LGMPP). Posteriormente, o DNA total extraído das amostras de grãos de Kefir foi submetido à reação de PCR do gene 16 SrRNA, e os amplicons obtidos foram clonados e transformados. Aleatoriamente, foram selecionadas 80 colônias que foram analisadas por PCR, utilizando primers específicos do vetor TOPO 2.1. Os amplicons gerados de 50 colônias transformantes foram digeridos separadamente com as enzimas *TaqI* e *Sau3AI*, para agrupamento das amostras e posterior sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia (ZANIRATTI, 2012).

As linhagens foram classificadas de acordo com sua localidade (cidade) e origem (kefir de leite ou kefir de água), sendo seis linhagens de *Lactobacillus* (*L. perolens*, *L. casei*, *L. satsumensis* e *L. mali*); uma linhagem de *Leuconostoc mesenteroides*; e uma linhagem de *Lactococcus lactis* (Quadro 4) (ZANIRATI, 2012).

Quadro 4 - Linhagens de bactérias lácticas (BAL) utilizadas neste estudo

Espécie	Fonte*	Classificação**	Código
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ICB/UFMG	KLSA	23P3
<i>Lactobacillus casei</i>	ICB/UFMG	KABH	17U
<i>Lactobacillus perolens</i>	ICB/UFMG	KASA	11P3
<i>Lactobacillus mali</i>	ICB/UFMG	KACI	21U2
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	ICB/UFMG	KACU	18P
<i>Lactobacillus perolens</i>	ICB/UFMG	KACU	17P2
<i>Lactococcus lactis</i>	ICB/UFMG	KLCU	3P
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	ICB/UFMG	KLVI	13U2

*ICB/UFMG, Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais (Minas Gerais, Brasil).

** KLSA - Kefir de leite de Salvador; KASA - Kefir de água de Salvador; KLCU - Kefir de leite de Curitiba; KACU - Kefir de água de Curitiba; KLVI - Kefir de leite de Viçosa; KAVI - Kefir de água de Viçosa; KABH - Kefir de água de Belo Horizonte; KLDI - Kefir de leite de Divinópolis.

Fonte: ZANIRATI, 2012.

4.1.2 Matéria-prima e ingredientes do embutido cárneo fermentado

A matéria-prima e os ingredientes utilizados na elaboração do embutido cárneo fermentado estão relacionados no Quadro 5.

Quadro 5 - Relação das matérias-primas utilizadas na elaboração do embutido cárneo fermentado

Matéria - prima	Fornecedor	Cidade – Estado	País
Pernil suíno	Cristal Frigo Ind. e Com. Imp. e Exp. LTDA	Belo Horizonte – MG	Brasil
Lombo suíno	Cristal Frigo Ind. e Com. Imp. e Exp. LTDA	Belo Horizonte – MG	Brasil
Toucinho	Cristal Frigo Ind. e Com. Imp. e Exp. LTDA	Belo Horizonte – MG	Brasil
Sal sem iodo	Henrique Lage Salineira do Nordeste	Macau – RN	Brasil
Sal de cura	Duas Rodas Industrial	Jaraguá do Sul - RS	Brasil
Antioxidante	Duas Rodas Industrial	Jaraguá do Sul - RS	Brasil
Pimenta do reino	Fuchs Gewürze do Brasil LTDA	Itupeva - SP	Brasil
Noz Moscada	Fuchs Gewürze do Brasil LTDA	Itupeva - SP	Brasil
Dextrose	Tradal Brazil	São Paulo - SP	Brasil
Vinho Tinto Lapunta	Premium Wine	Belo Horizonte - MG	Brasil
Alho	Comércio local	Belo Horizonte - MG	Brasil
Bactoform® T-SPX	Chr. Hansen A/S	Hørsholm	Dinamarca
Envoltório Natural	Distribuidora Triângulo LTDA	Belo Horizonte - MG	Brasil
Embalagem	Distribuidora Triângulo LTDA	Belo Horizonte - MG	Brasil

A cultura comercial utilizada foi a Bactoferm® T-SPX da empresa Chr. Hansen A/S (Hørsholm, Dinamarca). Trata-se de uma cultura mista constituída de uma BAL, *Pediococcus pentosaceus*, e de um *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus xylosus*.

4.2 Métodos

4.2.1 Ativação e manutenção das culturas bacterianas

As linhagens de bactérias lácticas foram ativadas em caldo MRS (Difco®, Detroit, Michigan, EUA), em concentração 2% (100 µL/ 5 mL). As culturas foram incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Após crescimento em sua primeira ativação, realizou-se mais uma ativação.

As culturas obtidas da segunda ativação foram estriadas por esgotamento em placas contendo ágar MRS (Difco®, Detroit, Michigan, EUA), a fim de verificar sua pureza. Posteriormente, foi realizada a coloração de Gram para evitar que culturas contaminadas prosseguissem no experimento.

A manutenção das culturas puras foi feita a partir do cultivo das mesmas em caldo MRS, as quais foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 1500 µL foram transferidas para tubos criogênicos e adicionadas de 20% glicerol. Os tubos criogênicos foram armazenados em ultra-freezer (Revco Scientific, Asheville, North Carolina, EUA), a -80°C, até o momento de sua utilização.

A cultura comercial em pó foi armazenada a temperatura de -17°C, sendo utilizada dentro do prazo de validade 18 meses, conforme as instruções do fabricante.

4.2.2 Seleção da linhagem de bactéria láctica como cultura iniciadora

A seleção das linhagens a serem utilizadas como cultura iniciadora de embutido cárneo fermentado baseou-se no seu crescimento e capacidade de acidificação.

4.2.2.1 Capacidade de acidificação

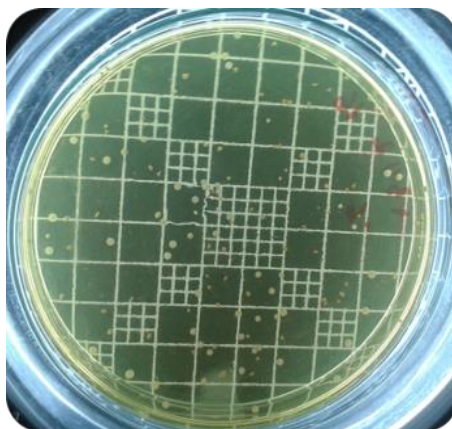
A partir da ativação das linhagens de bactérias lácticas armazenadas em ultra-freezer a -80°C, foi conduzido o teste de capacidade de acidificação. Uma alíquota de 100 µL

de inóculo foi transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo MRS para cada amostra, em duplicata. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C, por um período de 24 horas. Em intervalos de 2 horas, durante as 24 horas de incubação, o pH foi mensurado com o auxílio de um potenciômetro digital (Quimis Q-400 A), previamente calibrado com solução tampão de pH 4 e 7.

4.2.2.2 Curva de crescimento microbiano

Primeiramente, as linhagens de bactérias lácticas armazenadas em ultra-freezer a -80°C foram ativadas. A partir do cultivo com 24 horas de crescimento, foram transferidos 200 µL de inóculo para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS, para cada cultura separadamente. Os tubos foram incubados em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Em intervalos de 2 horas, durante 24 horas de incubação, uma alíquota de 1 mL do cultivo foi retirada e submetida a diluições decimais até 10⁻⁸, utilizando 9 mL de água peptonada 0,1%. Em seguida, foram plaqueadas em profundidade (*pour plate*) em caldo MRS com 1,5% de ágar, em duplicata, e incubadas a 37°C, por 48 horas. Após 48 horas de incubação, realizou-se a contagem das colônias de bactérias lácticas. A curva de crescimento foi expressa em log UFC. mL⁻¹. Foram realizadas duas repetições por linhagem de BAL estudada.

Figura 2 - Contagem das colônias de BAL



4.2.3 Preparo da linhagem de bactéria láctica selecionada para aplicação no embutido cárneo fermentado

O nível de inóculo aplicado à massa de carne para a fermentação do embutido deve ser em torno de 6 - 8 log UFC por grama de massa do produto (LÜCKE, 2000). Para

isso, as bactérias lácticas selecionadas, armazenadas em ultra-freezer a -80°C, foram ativadas. Em seguida, foi transferida uma alíquota de 200 µL de inóculo para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo MRS, e incubado a 37°C, por 12-18 horas, baseado na análise de curva de crescimento microbiano. Foram utilizados 10 mL de inóculo de cada BAL selecionada com contagem em torno de 9 log UFC . mL⁻¹ por Kg de massa do produto. A cultura comercial foi adicionada na proporção recomendada pelo fabricante, sendo 250 mg de cultura para 1 Kg de carne, previamente solubilizada em 100 mL de água mineral.

4.2.4 Elaboração do embutido cárneo fermentado

Foi elaborado um salame tipo italiano, como embutido cárneo fermentado, utilizando-se carne suína, toucinho, cloreto de sódio, nitrato e nitrito de sódio, ascorbato de sódio, condimentos e açúcar (MAPA, 2000) (Quadro 6).

Quadro 6 - Formulação do Salame tipo italiano

Ingredientes	Peso (%/Kg de massa)
Pernil suíno	68,96
Cabeça de Lombo	12,93
Toucinho	9,48
Sal sem iodo (grosso moído)	2,37
Sal de cura	0,21
Antioxidante	0,21
Pimenta do reino	0,12
Noz moscada	0,02
Dextrose	0,68
Vinho tinto	0,86
Alho	0,08

A carne suína e o toucinho, à temperatura de 0°C, foram moídos em disco de 10 mm, em moedor de carne da marca CAF-10 NR 12 (Rio Claro, São Paulo, Brasil). Os ingredientes não cárneos foram adicionados e misturados manualmente. Em seguida, a massa foi dividida em três porções iguais, sendo uma para o tratamento Controle (SCO), sem adição de cultura iniciadora; uma segunda, a qual foi adicionada de cultura iniciadora comercial para salame (SCC); e uma terceira porção que foram adicionadas as linhagens de bactérias lácticas selecionadas como potencial cultura iniciadora (SCS).

O embutimento foi realizado através de uma embutideira manual, em envoltório natural. A identificação dos diferentes tratamentos foi feita utilizando-se etiquetas. Após o

embutimento, as peças foram levadas para uma câmara de incubação B.O.D. da marca Fanem® modelo 347 (São Paulo, Brasil) para a etapa de fermentação.

No período de fermentação, os salames foram mantidos à temperatura de 30°C, até que as peças atingissem o pH de 5,3, ou até quando o tratamento SCS atingisse esse pH. Ao final da fermentação, as peças de salame foram levadas à câmara de maturação, mantida à temperatura de 10°C, com a umidade relativa em torno de 95%. A maturação foi encerrada quando as peças atingiram Aw de 0,90.

Figura 3 - Etapas do processamento do salame tipo italiano



(1) Pesagem dos ingredientes; (2) Moagem da carne suína e toucinho; (3) Mistura dos ingredientes; (4) Divisão dos tratamentos e adição de cultura iniciadora; (5) Embutimento; (6) Fermentação; (7) Maturação; (8) Embalagem a vácuo e; (9) Armazenamento.

A umidade relativa do ambiente interno foi mantida com o auxílio de um umidificador acoplado à câmara, com exceção do processo fermentativo, em que a umidade do produto foi suficiente para manter a umidade relativa do ambiente. Os processos de fermentação e de secagem das peças de salame foram realizados ao abrigo da luz.

Com a finalização do processo de maturação, foi retirado o envoltório natural de cada peça manualmente e os salames foram acondicionados, individualmente, em embalagem

plástica a vácuo e armazenados em câmara de incubação B.O.D, à temperatura de $20 \pm 1^\circ \text{C}$. As etapas do processamento do salame tipo italiano estão representadas na Figura 3.

4.2.5 Avaliação dos tratamentos de salame tipo italiano

As alterações nas características físico-químicas dos tratamentos de salame, durante o período de fermentação/maturação, foram verificadas através das análises de pH, perda de peso e atividade de água (A_w). No produto maturado, foram feitas as análises de pH, cor, atividade de água (A_w) e maciez objetiva nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento. Além disso, foram feitas avaliação microbiológica e a caracterização físico-química dos salames, com o objetivo de verificar se o produto atende aos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação para salame (BRASIL, 2000, 2001).

4.2.5.1 Análises físico-químicas

4.2.5.1.1 Avaliação do pH

A cultura iniciadora tecnologicamente adequada deve reduzir o valor de pH do produto até 5,3 (AMMOR; MAYO, 2007). Sendo assim, o pH foi mensurado no período de fermentação nos tempos 0, 4, 8, 20, 26 e 34 horas ou até que a massa do salame atingisse um $\text{pH} \leq 5,3$, e, em seguida, a cada 7 dias, durante o período de maturação. Ao final do período de maturação dos salames, o pH foi mensurado nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento.

O pH das amostras foi medido utilizando um pHmetro modelo HI 221 marca Hanna Instruments (São Paulo, Brasil), composto por duas sondas, sendo uma para medir temperatura e outra para pH. O eletrodo do equipamento foi previamente calibrado com soluções tampões pH 4 e 7, e, em seguida, foi introduzido na peça de salame, sendo realizadas três medições por peça (Figura 4). Foi analisada uma peça de cada tratamento escolhida aleatoriamente em cada tempo de análise para cada repetição, exceto para os períodos de fermentação e maturação, nos quais uma peça de cada tratamento foi monitorada ao longo dos períodos. Até o final do período de maturação foram analisadas 9 repetições, e a partir do período de armazenamento 6 repetições.

Figura 4 - Análise de pH durante a maturação



4.2.5.1.2 Determinação da atividade de água (A_w)

O salame tipo italiano deve ter no máximo 0,90 de atividade de água (BRASIL, 2000). A atividade de água foi determinada utilizando-se um medidor específico para atividade de água modelo AquaLab CX2 (Decagon Devices Inc.®, Pullman, Estados Unidos). Fatias de aproximadamente 3 mm de espessura, sem as bordas, foram dispostas em recipientes próprios para a análise, com exceção da massa que foi distribuída uniformemente no recipiente, com o auxílio de uma espátula. Após atingir o equilíbrio, foi dado o valor da atividade de água (Figura 5).

O aparelho foi previamente calibrado com uma solução saturada de NaCl, que possui atividade de água de 0,75, à temperatura ambiente (20 a 25°C) (BRASIL, 1999). A determinação da atividade de água foi feita logo após a elaboração do salame, durante a maturação a cada 7 dias e, ao final da maturação dos salames, nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento. Foi analisada uma peça de cada tratamento, escolhida aleatoriamente em cada tempo de análise para cada repetição, sendo uma medição por peça. Até o final do período de maturação foram analisadas 9 repetições, e a partir do tempo de armazenamento 6 repetições.

Figura 5 - Análise de determinação de atividade de água (A_w)



4.2.5.1.3 Avaliação da perda de peso

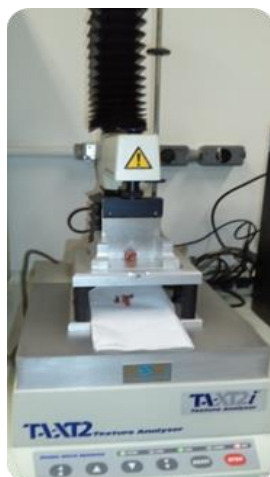
Com a finalidade de acompanhar a perda de peso das peças de salame, durante o processo de fermentação e maturação, as peças foram pesadas logo após a elaboração, durante a fermentação após 24 e 48 horas, e durante a maturação dos salames a cada 7 dias, até o final do processo de secagem. Foram analisadas 7 peças de cada tratamento para cada repetição, sendo 9 repetições.

4.2.5.1.4 Determinação da maciez objetiva

A maciez objetiva foi avaliada com a finalidade de detectar alterações de textura do salame diante dos tratamentos e em função do tempo de armazenamento. A análise foi realizada ao final da maturação dos salames, nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento. Foi escolhida uma peça aleatoriamente por tratamento em cada tempo de análise para cada repetição, sendo 6 repetições. Foram retirados 6 cilindros, perpendicularmente à superfície das amostras de salame, medindo aproximadamente 1,27 cm de diâmetro utilizando uma sonda vazada, removidos da porção interna de cada salame.

A análise foi feita em um texturômetro modelo TA-XT2i (Stable Micro Systems®, England), utilizando lâmina tipo Warner Bratzler (Figura 6). O aparelho foi configurado da seguinte maneira: velocidade pré-teste 1,0mm/s; velocidade do teste 2,0 mm/s; velocidade após o teste 15,0mm/s; e a distância percorrida pela lâmina após ter atingido a parte superior da amostra 15,0mm. Os resultados foram expressos em Kgf. O cálculo da força de cisalhamento foi feito através do programa Texture Expert (SMS, 1997).

Figura 6 - Determinação de maciez objetiva



4.2.5.1.5 Determinação de cor

A cor foi medida com a finalidade de avaliar as alterações de cor do salame diante dos tratamentos e em função do tempo de armazenamento. A análise foi feita ao final da maturação dos salames, nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento. Foi analisada uma peça escolhida aleatoriamente por tratamento em cada tempo de análise para cada repetição, sendo 6 medições por peça e 6 repetições.

Para a mensuração da cor, foi utilizado o equipamento Minolta Chroma Meter CR- 400 (Minolta Câmera Co., Osaka, Japan). As medições foram realizadas diretamente sobre as amostras cobertas com plástico filme, em que “L*” corresponde ao brilho, “a*” ao índice de cor vermelha e “b*” ao índice de cor amarela (Figura 7). O equipamento foi previamente calibrado com porcelana padrão ($Y = 93,8$, $x = 0,3130$ e $y = 0,3191$).

Figura 7 - Determinação de cor



4.2.5.2 Composição centesimal

As análises referentes à composição centesimal (lipídeos, proteína, umidade, cinzas e cloretos) foram feitas, conforme metodologia da Instrução Normativa nº 20 (BRASIL, 1999). As análises foram feitas na massa do salame, após a mistura dos ingredientes, ao final da maturação e com 30 dias de armazenamento. Para cada tempo, foi analisada uma peça aleatoriamente por tratamento para cada repetição, sendo de 6 repetições.

4.2.5.2.1 Umidade

As placas de Petri utilizadas para a análise foram colocadas em estufa marca FANEM® modelo 315SE (São Paulo, Brasil), a 105°C, durante 1 hora. Esfriou-se em dessecador e pesou-se 5,00 gramas de amostra. As placas contendo as amostras foram levadas para estufa a 105°C, por aproximadamente 15 horas, apresentando peso constante. Esfriou-se em dessecador e pesou-se. Foram realizadas 6 pesagens para cada tratamento. Após a determinação de umidade, as amostras foram utilizadas para a determinação de lipídios, proteínas e cinzas, sendo duas amostras destinadas para cada análise.

Cálculo:

$$\% \text{ umidade e voláteis} = \frac{100 \times p}{p'}$$

Onde:

p = perda de massa em gramas;

p' = massa da amostra em gramas.

4.2.5.2.2 Determinação de lipídeos (método Soxhlet)

A amostra, após a determinação da umidade, foi pesada em papel filtro e transferida para um cartucho de extração. Colocou-se o cartucho mais amostra no extrator de Soxhlet e foi feita a extração com 100 mL de éter etílico em um determinador de gordura TE-044, marca TECNAL (Piracicaba, São Paulo, Brasil), a 50°C. Após 10 horas, o éter foi recuperado, ficando apenas a gordura extraída da amostra no copo de extração. O copo contendo a gordura foi retirado e colocado em estufa a 105°C, por 1 hora. Esfriou-se em dessecador e pesou-se o copo com a gordura.

Cálculo:

$$\% \text{ lipídios} = \frac{100 \times p}{p'}$$

Onde:

p = massa de lipídios extraídos em gramas;

p' = massa da amostra em gramas.

4.2.5.2.3 Nitrogênio total e protídeos (método Kjeldahl)

Após a determinação da umidade, pesou-se aproximadamente 0,25 g de amostra seca, em tubo de micro Kjeldahl. Para a etapa de digestão das amostras, foram adicionados 2,5 g de mistura catalítica e 7 mL de ácido sulfúrico p.a. As amostras foram transferidas para o bloco digestor e foram aquecidas lentamente até atingirem 400°C. Quando o líquido se tornou límpido, de tonalidade azul-esverdeado, as amostras foram retiradas do bloco digestor. Após as amostras esfriarem, adicionaram-se aproximadamente 10 mL de água destilada. A digestão resulta em sulfato de amônio a partir do nitrogênio da amostra.

A destilação foi realizada em um microdestilador modelo TE-012, marca TECNAL (Piracicaba, São Paulo, Brasil). Foi adicionado solução de hidróxido de sódio a 50 % até que a solução se tornasse negra (em torno de 25 mL). O destilado contendo amônia foi coletado em um Erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4 %, adicionado de 4 a 5 gotas de solução de indicador misto vermelho de metila: verde de bromocresol (2:1). Procedeu-se a destilação até que o Erlenmeyer atingisse um volume de aproximadamente 100 mL. Em seguida, esta solução foi titulada com solução de ácido clorídrico 0,1 N, até a viragem do indicador.

Cálculo:

$$\% \text{ nitrogênio total} = \frac{V \times N \times f \times 0,014 \times 100}{p}$$

$$\% \text{ proteínas} = \% \text{ nitrogênio total} \times F$$

Onde:

V = mililitros de solução de ácido clorídrico 0,1 N gastos na titulação, após a correção do branco;

N = normalidade teórica solução de ácido clorídrico 0,1 N;

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N;

p = massa da amostra em gramas;

F = fator de conversão da relação nitrogênio/proteína, de acordo com o produto:

Carnes e derivados F = 6,25.

4.2.5.2.4 Resíduo mineral fixo (cinzas)

Os cadinhos usados na análise foram colocados em forno mufla a 550 °C, durante 30 minutos. Em seguida, foram resfriados em um dessecador, identificados e pesados em balança analítica. Após a determinação de umidade, pesou-se o valor referente a

aproximadamente 2,50 g da amostra úmida, diretamente nos cadinhos. As cinzas foram determinadas pela eliminação da matéria orgânica e inorgânica volátil, à temperatura de 550°C em forno mufla, marca EDG (São Carlos, São Paulo, Brasil), modelo 3P – S 7000. Os cadinhos permaneceram na mufla até obtenção de cinzas claras.

Foram transferidos ao dessecador onde permaneceram até esfriarem, sendo então pesados.

Cálculo:

$$\% \text{ cinzas} = \frac{100 \times p}{p'}$$

Onde:

p = massa das cinzas obtidas em gramas;

p' = massa da amostra em gramas.

4.2.5.2.5 Determinação de cloretos (método argentométrico)

A partir das amostras da determinação de resíduo mineral fixo, conduziu-se a determinação de cloretos. Adicionaram-se 2 a 3 gotas de ácido nítrico 1:9 para a dissolução das cinzas e 100 mL de água deionizada previamente aquecida. As amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo e coletadas em Erlenmeyer. Em seguida, foi feito o ajuste do pH do filtrado, quando necessário, entre 6,5 e 10,5, com solução de hidróxido de sódio 0,1N ou bicarbonato de sódio. Adicionou-se 1 mL de cromato de potássio a 5% e foi feita a titulação com solução de nitrato de prata 0,1N, até a coloração vermelho-tijolo.

Cálculo:

$$\% \text{ cloretos em NaCl} = \frac{V \times f \times N \times 100 \times 0,0585}{P}$$

Onde:

V = mililitros de solução de nitrato de prata 0,1 N gastos na titulação;

f = fator da solução de nitrato de prata 0,1 N;

p = massa da amostra em gramas;

N = normalidade da solução de nitrato de prata 0,1 N;

0,0585 = milequivalente grama do cloreto de sódio na normalidade trabalhada.

4.2.5.3 Avaliação microbiológica

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, através da Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, estabelece o padrão microbiológico para produtos

cárneos maturados como os salames. O limite estabelecido pela legislação para coliformes termotolerantes é de 10^3 UFC/g de produto; para *Staphylococcus* coagulase positiva é de 5×10^3 UFC/g de produto e; ausência de *Salmonella* spp. em 25g de produto (BRASIL, 2001).

As análises microbiológicas foram realizadas ao final do período de maturação, em triplicata para cada tratamento.

4.2.5.3.1 Coliformes termotolerantes

Foi feita a determinação de coliformes a 45°C, utilizando o método de Número mais provável de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes em Alimentos, descrito pelos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, Instrução Normativa n° 62/2003 (BRASIL, 2003).

4.2.5.3.2 *Staphylococcus* coagulase positiva

Foi realizada a análise de *Staphylococcus* coagulase positiva, através do método de contagem de *Staphylococcus aureus*, descrito pelos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, Instrução Normativa n° 62/2003 (BRASIL, 2003).

4.2.5.3.3 *Salmonella* spp.

Foi realizada a análise de *Salmonella* spp., através do método de Pesquisa de *Salmonella*, descrito pelos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, Instrução Normativa n° 62/2003 (BRASIL, 2003).

As amostras que obtiveram reação suspeita nos meios TSI (Triple Sugar Iron Agar) e LIA (Lysine Iron Agar) foram testadas em meio Rugai modificado, fabricado pela Renylab Química e Farmacêutica (Barbacena, Minas Gerais, Brasil). Este meio permite o teste de motilidade, lisina descarboxilase, urease, produção de gás sulfídrico, fermentação da glicose em profundidade e da sacarose na superfície do meio, gás em glicose, utilização do aminoácido L – triptofano (desaminação) e formação de indol.

4.3 Delineamento experimental e análise estatística

As análises de seleção das linhagens de BAL, para serem avaliadas como potencial cultura iniciadora de embutido cárneo fermentado, foram realizadas em duplicata, sendo que as médias obtidas foram avaliadas numericamente.

A partir da elaboração do embutido cárneo fermentado, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em que foram avaliados os 3 tratamentos de salame tipo italiano. Para as análises de pH e atividade de água, durante os períodos de fermentação e maturação, foram realizadas 9 repetições, sendo que uma peça de cada tratamento foi monitorada ao longo dos períodos de fermentação e maturação para cada repetição. Para a análise de perda de peso, durante os períodos de fermentação e maturação, foram realizadas 9 repetições, sendo que 7 peças de salame de cada tratamento foram monitoradas ao longo do período de fermentação e maturação para cada repetição.

Para as análises físico-químicas (pH, Aw, cor, maciez objetiva e composição centesimal) do período de armazenamento, foram realizadas 6 repetições. Para cada tempo, foi analisada uma peça aleatoriamente por tratamento para cada repetição.

Para a determinação de Coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. foram realizadas 9 repetições. Para cada repetição foi coletada uma peça de cada tratamento do produto finalizado.

Os resultados das análises microbiológicas dos salames tipo italiano foram avaliados por análise de variância não paramétrica Friedman, a 5% de probabilidade. Os dados das análises físico-químicas dos produtos foram avaliados por análise de variância ANOVA, sendo as médias obtidas comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Foi utilizado o software estatístico Infostat versão 2008 (DI RIENZO *et al.*, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção da linhagem de bactéria láctica como cultura iniciadora

5.1.1 Capacidade de acidificação

No Quadro 7, estão apresentados os valores de pH em função do tempo de incubação para cada linhagem de BAL.

Quadro 7 – Valores de pH dos meios de cultivo (MRS) das BAL em função do tempo de incubação

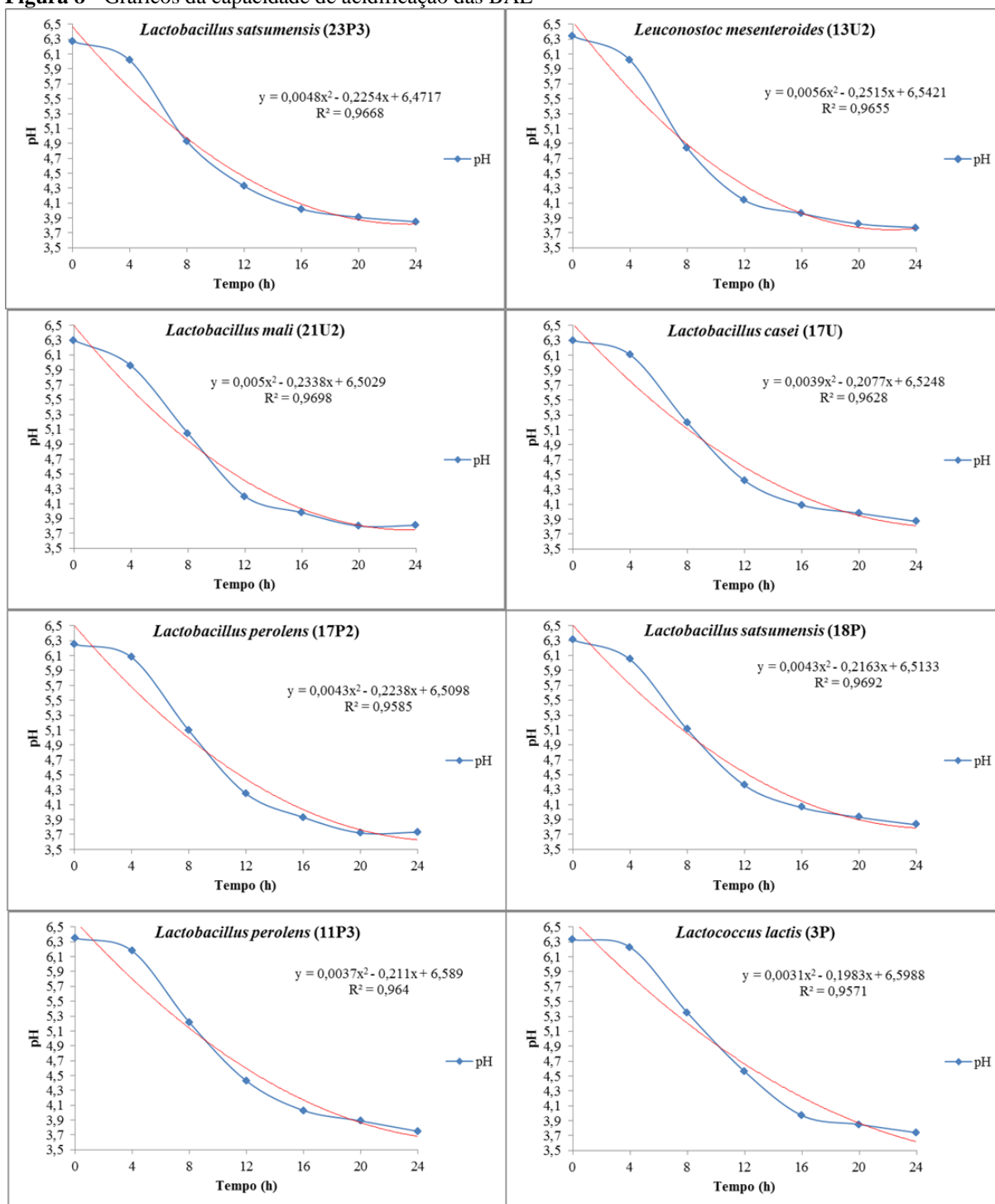
Culturas*	Tempo (horas)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
23P3	6,27	6,20	6,02	5,44	4,93	4,39	4,33	4,08	4,02	3,98	3,91	3,85	3,85
13U2	6,34	6,23	6,02	5,42	4,84	4,38	4,14	4,05	3,96	3,90	3,82	3,79	3,77
17U	6,30	6,29	6,11	5,64	5,20	4,86	4,42	4,21	4,09	4,04	3,98	3,94	3,87
18P	6,31	6,26	6,05	5,56	5,11	4,67	4,36	4,11	4,06	3,96	3,93	3,88	3,83
21U2	6,30	6,27	5,96	5,41	5,05	4,47	4,20	4,08	3,98	3,88	3,80	3,80	3,81
17P2	6,25	6,29	6,08	5,73	5,10	4,60	4,25	4,01	3,93	3,79	3,72	3,69	3,73
11P3	6,35	6,36	6,18	5,74	5,22	4,68	4,43	4,05	4,03	3,92	3,89	3,83	3,75
3P	6,33	6,35	6,23	5,91	5,35	4,85	4,56	4,03	3,97	3,96	3,85	3,85	3,74

* - 23P3: *Lactobacillus satsumensis* isolado de kefir de leite; 13U2: *Leuconostoc mesenteroides* isolado de kefir de leite; 17U: *Lactobacillus casei* isolado de kefir de água; 18P: *Lactobacillus satsumensis* isolado de kefir de água; 21U2: *Lactobacillus mali* isolado de kefir de água; 17P2: *Lactobacillus perolens* isolado de kefir de água; 11P3: *Lactobacillus perolens* isolado de kefir de água; 3P: *Lactococcus lactis* isolado de kefir de leite.

Todas as linhagens de BAL apresentaram capacidade de acidificação, em meio caldo MRS, ao final das 24 horas de incubação, a 37°C, sendo que os cultivos apresentaram pH abaixo de 3,90, com valores entre 3,73 e 3,87, independentemente da origem da linhagem do kefir (água ou leite) e de seu gênero (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactotoccus*). Este resultado é relevante visto que a rápida acidificação é uma característica importante para as culturas iniciadoras de embutidos cárneos crus fermentados, pois ocasionam a queda do pH da massa de carne, auxiliando na estabilidade do produto e na segurança microbiológica (HOLCK *et al.*, 2011).

A Figura 8 relaciona os valores de pH em função do tempo de incubação, permitindo visualizar a variação da capacidade de acidificação para cada linhagem de BAL.

Figura 8 - Gráficos da capacidade de acidificação das BAL



23P3: *Lactobacillus satsumensis* isolado de kefir de leite; 13U2: *Leuconostoc mesenteroides* isolado de kefir de leite; 17U: *Lactobacillus casei* isolado de kefir de água; 18P: *Lactobacillus satsumensis* isolado de kefir de água; 21U2: *Lactobacillus mali* isolado de kefir de água; 17P2: *Lactobacillus perolens* isolado de kefir de água; 11P3: *Lactobacillus perolens* isolado de kefir de água; 3P: *Lactococcus lactis* isolado de kefir de leite.

Observa-se que, conforme o aumento do tempo de incubação, ocorre a proximidade entre os valores de pH dos meios de cultivo das linhagens avaliadas. Os pHs

iniciais do caldo MRS inoculados com as linhagens de BAL variaram entre 6,25 e 6,35. Nas primeiras 8 horas de incubação a 37 °C, observou-se uma intensa queda de pH para todas as linhagens de BAL avaliadas, sendo que as linhagens *Lactobacillus satsumensis* 23P3 e *Leuconostoc mesenteroides* 13U2, ambas provenientes de kefir de leite, foram capazes de reduzir o pH para 4,93 e 4,84, respectivamente.

Resultados similares foram observados em estudo realizado para avaliar a capacidade de acidificação de bactérias lácticas isoladas de amostras de salames fermentados naturalmente. O valor final, após 24 horas de fermentação em caldo MRS, variou de 3,56 a 4,52, sendo que a maioria das linhagens alcançou pH abaixo de 3,8 (SANTA, 2008).

Hugas *et al.* (1993), ao avaliarem linhagens de *Lactobacillus plantarum* isoladas de um embutido cru fermentado, relataram que 68% das linhagens proveram uma redução do pH do caldo MRS, após 24 horas para valores inferiores a 3,9, corroborando com os resultados deste experimento.

Outros estudos apontaram valores superiores aos apresentados, porém com bons resultados de redução de pH. Greco *et al.* (2005) avaliaram a capacidade de acidificação de bactérias lácticas isoladas, durante o período de maturação de um embutido fermentado típico italiano. A média dos valores de pH, obtido após 24 horas, foi de 4,2, com variação entre 3,85 e 5,36.

Sawitzki *et al.* (2009) testaram a capacidade de acidificação de linhagens de *Lactobacillus plantarum* isoladas de salame tipo milano. Durante a fermentação em caldo MRS, os valores de pH decresceram do valor inicial de 6,47 para 4,43, em 16h de fermentação, permanecendo este valor médio de pH até o período final de 24h de fermentação.

FERNANDEZ *et al.* (2013) avaliando a capacidade de acidificação das espécies *Lactococcus lactis* UL719, *Pediococcus acidilactici* UL5 e *Lactococcus lactis* ATCC 11454, em caldo MRS, observaram uma intensa produção de ácido, em que o pH foi reduzido de 6,0 para 4,4, 3,8 e 4,6, respectivamente.

Foram realizados testes de capacidade de acidificação *in vitro* com o objetivo de se determinar a linhagem de BAL com maior potencial de reduzir o pH em menor tempo, através da produção de ácido láctico. Desse modo, observou-se que todas as linhagens de BAL testadas foram capazes de promover uma rápida acidificação, ou seja, resultar em valores numéricos de pH abaixo de 5,3, que é o recomendado e tecnologicamente adequado para esse tipo de produto (AMMOR; MAYO, 2007). O American Meat Institut (AMI, 1997)

estabeleceu que para garantir a segurança sanitária aos produtos cárneos crus fermentados, como é o caso do salame tipo italiano, esses produtos devem atingir um pH de 5,3 ou inferior; assim, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, dentre outros patógenos, são eficazmente controlados ao final do período de fermentação.

As linhagens *Lactobacillus satsumensis* 23P3 e *Leuconostoc mesenteroides* 13U2 mostraram-se numericamente capazes de acidificar mais rapidamente que as demais linhagens de BAL, alcançando, após 8 horas de incubação, os menores valores de pH.

5.1.2 Curva de crescimento microbiano

No Quadro 8, estão apresentados os valores obtidos nas contagens (log UFC.mL⁻¹) das linhagens de BAL, cultivadas em meio MRS, em função do tempo de incubação a 37° C, que foram utilizados para curva de crescimento.

Quadro 8 – Médias das contagens de BAL (log UFC.mL⁻¹) em caldo MRS em função do tempo de incubação a 37° C

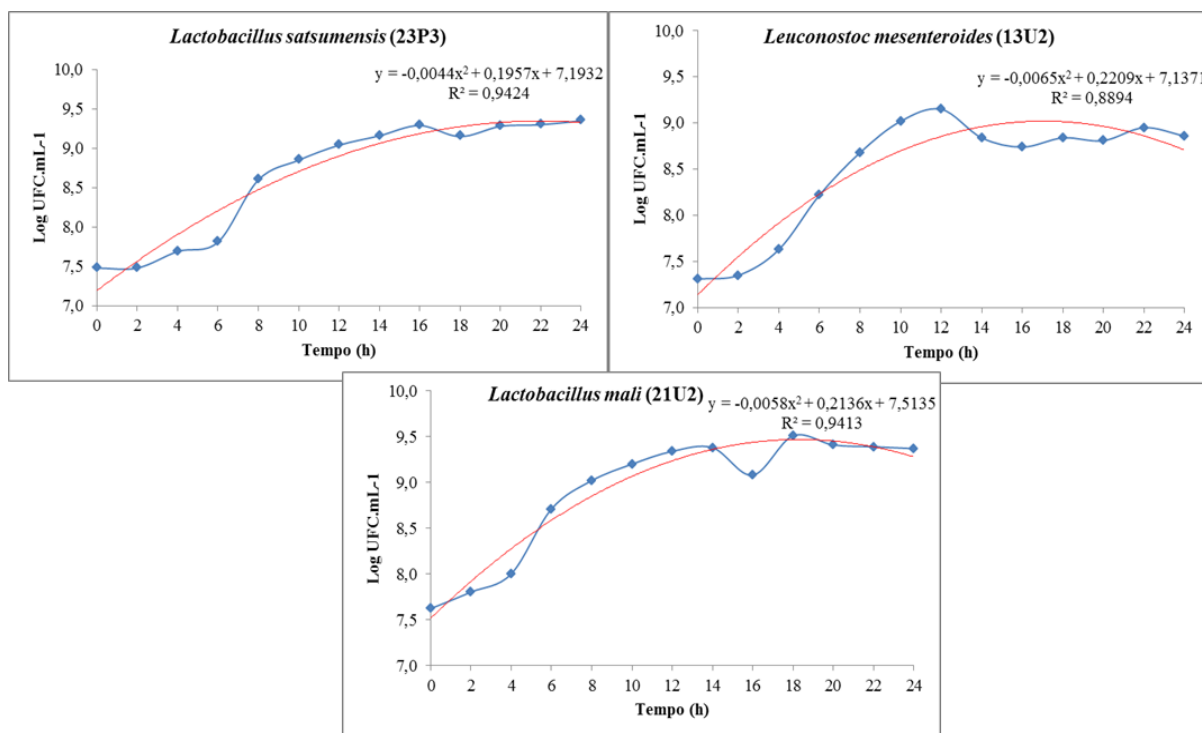
Culturas*	Tempo (horas)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
23P3*	7,48	7,48	7,69	7,81	8,60	8,85	9,04	9,16	9,29	9,15	9,28	9,30	9,35
13U2	7,31	7,35	7,63	8,22	8,68	9,02	9,15	8,84	8,74	8,84	8,81	8,95	8,86
17U	7,42	7,60	7,81	8,11	8,44	8,90	9,01	9,07	9,11	9,18	9,19	9,38	9,18
18P	7,31	7,31	7,43	7,80	8,33	8,79	9,01	8,88	8,96	9,09	9,12	9,19	9,16
21U2	7,62	7,80	8,00	8,71	9,02	9,20	9,34	9,38	9,08	9,51	9,41	9,39	9,37
17P2	7,19	7,28	7,44	7,57	8,31	8,66	8,94	9,14	9,09	9,07	9,08	9,00	9,11
11P3	7,23	7,19	7,41	7,59	8,01	8,47	9,04	9,14	9,14	9,23	9,05	9,27	9,07
3P	7,13	7,20	7,48	7,41	7,95	8,43	8,57	9,19	9,15	9,44	9,15	9,36	8,90

* - 23P3: *Lactobacillus satsumensis* isolado de kefir de leite; 13U2: *Leuconostoc mesenteroides* isolado de kefir de leite; 17U: *Lactobacillus casei* isolado de kefir de água; 18P: *Lactobacillus satsumensis* isolado de kefir de água; 21U2: *Lactobacillus mali* isolado de kefir de água; 17P2: *Lactobacillus perolens* isolado de kefir de água; 11P3: *Lactobacillus perolens* isolado de kefir de água; 3P: *Lactococcus lactis* isolado de kefir de leite.

Os inóculos iniciais para as linhagens de BAL incubadas a 37° C apresentaram contagens, em caldo MRS, variando entre 7,13 e 7,62 log UFC.mL⁻¹. Todas as linhagens de BAL atingiram o número máximo de UFC.mL⁻¹ em torno de 9 log em algum momento das 24 horas de incubação a 37°C.

Na Figura 9, estão relacionadas as curvas de crescimento de *Lactobacillus satsumensis* 23P3, *Lactobacillus malis* 21U2 e *Leuconostoc mesenteroides* 13U2 e seus valores obtidos nessas contagens (Log UFC.ml⁻¹).

Figura 9 - Gráficos das curvas de crescimento microbiano das BAL 23P3, 21U2 e 13U2



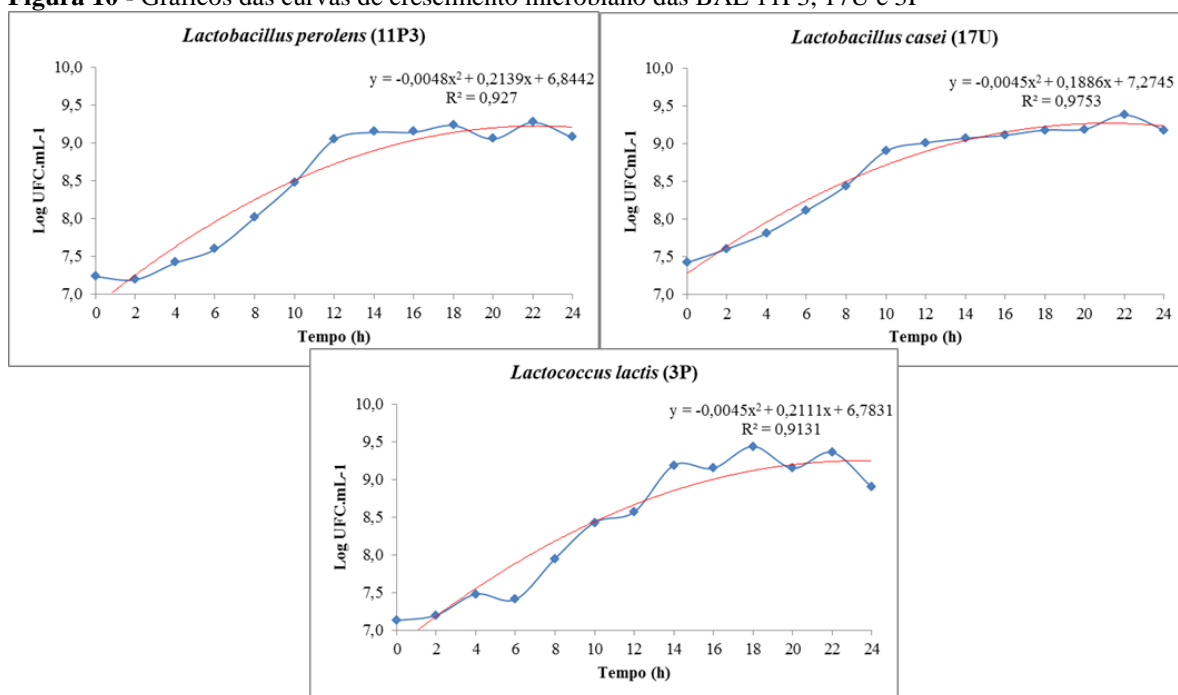
23P3: *Lactobacillus satsumensis* isolado de kefir de leite; 21U2: *Lactobacillus mali* isolado de kefir de água; 13U2: *Leuconostoc mesenteroides* isolado de kefir de leite;

Após as primeiras 8 horas de incubação, as três linhagens que apresentaram as maiores contagens numéricas foram *Lactobacillus malis* 21U2, *Leuconostoc mesenteroides* 13U2 e *Lactobacillus satsumensis* 23P3, com um incremento de contagem de 1,40 log UFC.mL⁻¹, 1,37 log UFC.mL⁻¹ e 1,12 log UFC.mL⁻¹, respectivamente.

A linhagem *Lactobacillus mali* 21U2 atingiu sua fase estacionária após 12 horas de incubação, quando passou a ter uma população variando em torno de 9,30 log UFC.mL⁻¹ até o final das 24 horas. Esta linhagem obteve o crescimento máximo de 1,85 log UFC.mL⁻¹ ao longo das 24 horas. A linhagem *Leuconostoc mesenteroides* 13U2 atingiu o máximo crescimento após 12 horas, com o aumento de 1,84 log UFC.mL⁻¹. Em seguida, nas próximas duas horas, reduziu seu crescimento e manteve-se na fase estacionária até o término das 24 horas, finalizando com uma população de 8,86 log UFC.mL⁻¹. A linhagem de *Lactobacillus satsumensis* 23P3 alcançou seu melhor crescimento com 24 horas, com o aumento de 1,87 log UFC.mL⁻¹.

Na Figura 10, estão relacionadas as curvas de crescimento de *Lactobacillus perolens* 11P3, *Lactococcus lactis* 3P e *Lactobacillus casei* 17U e seus valores obtidos nessas contagens (log UFC.ml⁻¹).

Figura 10 - Gráficos das curvas de crescimento microbiano das BAL 11P3, 17U e 3P

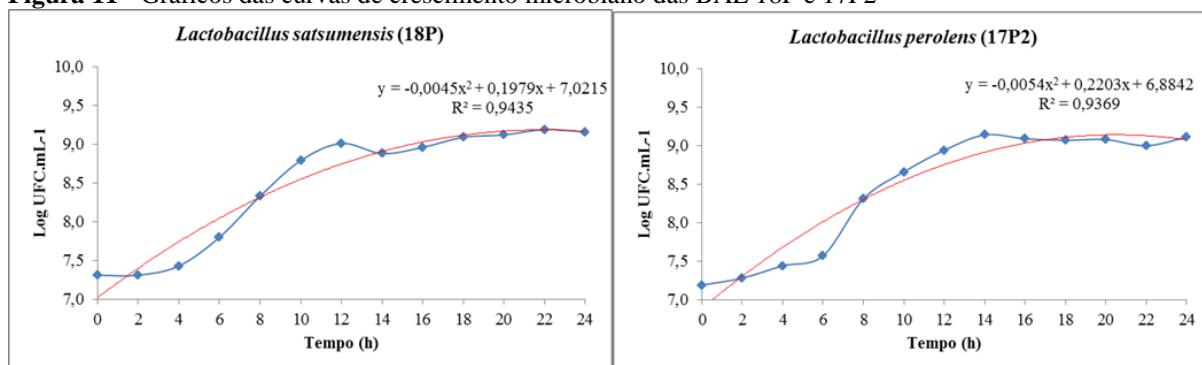


11P3: *Lactobacillus perolens* isolado de kefir de água; 17U: *Lactobacillus casei* isolado de kefir de água; 3P: *Lactococcus lactis* isolado de kefir de leite.

As linhagens *Lactobacillus perolens* 11P3, *Lactococcus lactis* 3P e *Lactobacillus casei* 17U não apresentaram um crescimento numérico tão expressivo nas primeiras 8 horas como as linhagens relatadas anteriormente, embora tenham atingido incrementos de contagem de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos, após 18 horas de crescimento, para *Lactobacillus casei* 17U e, após 22 horas de crescimento, para *Lactobacillus perolens* 11P3 e *Lactococcus lactis* 3P. A linhagem de *Lactococcus lactis* 3P apresentou redução nas contagens com 24 horas de incubação, ficando com uma população de $8,90 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, assim como *Lactobacillus casei* 17U e *Lactobacillus perolens* 11P3, que tiveram um pico de crescimento com 22 horas e uma diminuição no crescimento com 24 horas. A linhagem *Lactobacillus casei* 17U apresentou a fase estacionária a partir de 14 horas de crescimento, mantendo até 24 horas, sendo que com 22 horas de incubação houve uma oscilação na contagem.

Na Figura 11, estão relacionadas as curvas de crescimento das BAL *Lactobacillus perolens* 17P2 e *Lactobacillus satsumensis* 18P e os valores obtidos nessas contagens ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$).

Figura 11 - Gráficos das curvas de crescimento microbiano das BAL 18P e 17P2



18P: *Lactobacillus satsumensis* isolado de kefir de água; 17P2: *Lactobacillus perolens* isolado de kefir de água.

Lactobacillus perolens 17P2 e *Lactobacillus satsumensis* 18P alcançaram o aumento da contagem inicial de 1,92 e 1,88 log UFC.mL⁻¹ respectivamente, valores semelhantes aos relatados primeiramente para *Lactobacillus satsumensis* 23P3, *Lactobacillus malis* 21U2 e *Leuconostoc mesenteroides* 13U2. Não houve grande variação numérica entre as bactérias, sendo que o crescimento das BAL variou de 1,85 a 2,31 log UFC.mL⁻¹ em 24 horas, com média de 1,96 log UFC.mL⁻¹.

Fernandez *et al.* (2013) estudaram a cinética do crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar *diacetylactis* UL719, *Pediococcus acidilactici* UL5 e *Lactococcus lactis* ATCC 11454 em Caldo MRS. As culturas foram incubadas em anaerobiose a 37°C, por 24 horas. A primeira linhagem apresentou crescimento de 1,6 log UFC.mL⁻¹ após 3 horas, sendo que após 16 horas houve um declínio significativo. A linhagem de *Pediococcus acidilactici* obteve um aumento de 2 ciclos logarítmicos após 6 horas e este resultado se manteve ao longo das 24 horas. O menor crescimento foi atingido pela linhagem de *Lactococcus lactis* ATCC 11454, a qual obteve crescimento inferior a 1,5 log UFC.mL⁻¹ após 6 horas, permanecendo até 24 horas.

Castro *et al.* (2011) analisaram o crescimento de *Lactobacillus sakei* ATCC 15578 cultivadas em caldo MRS. Após 15 horas de incubação a 30°C, atingiu o auge do crescimento e iniciou-se a fase estacionária, a qual continuou até 24 horas de incubação. O resultado foi similar ao encontrado para as linhagens de BAL do presente estudo, as quais apresentaram o início da fase estacionária entre 12 e 14 horas de incubação, mantendo-se até 24 horas, com exceção da linhagem de *Lactococcus lactis* 3P. No tempo inicial, os valores encontrados pelos autores corroboram com os valores encontrados para as BAL em questão, 7,2 log UFC.mL⁻¹, enquanto durante a fase estacionária apresentou contagens em torno de 8,7 log UFC.mL⁻¹, inferior aos valores encontrados neste experimento, no qual todas as BAL alcançam 9 log UFC.mL⁻¹.

As espécies do gênero *Lactobacillus* são predominantes dentro do grupo de BAL na microbiota do salame, além de serem espécies que conseguem competir bem com a microbiota endógena deste produto (TALON; LEROY, 2011). A capacidade de se multiplicar em meio ácido é uma condição fundamental para que a cultura tenha condições de proporcionar uma boa acidificação na massa de carne, durante o processamento de salames (BUCKENHÜSKES, 1993). O critério de seleção para potencial cultura iniciadora de salame foi estabelecido segundo a habilidade de rápido crescimento e rápida produção de ácido lático com alto poder de acidificação, logo nas primeiras horas (BUCKENHÜSKES, 1993; HOLZAPFEL, 2002).

Visto que as BAL que apresentaram melhor crescimento nas primeiras 8 horas foram as mesmas que obtiveram menor pH no mesmo período, este resultado corrobora com a afirmação de que o rápido crescimento das BAL está diretamente relacionado a maior capacidade de acidificação (ARO-ARO *et al.*, 2010).

Portanto, as BAL selecionadas com potencial como cultura iniciadora em embutido cárneo fermentado, foram as linhagens de *Lactobacillus satsumensis* 23P3 e *Leuconostoc mesenteroides* 13U2, as quais apresentaram rápida acidificação e rápido crescimento *in vitro* nas primeiras horas. Não há trabalhos que relatam o uso de *Lactobacillus satsumensis* 23P3 como cultura iniciadora de um produto fermentado, sendo esta espécie recentemente descrita como uma nova espécie de *Lactobacillus* (ENDO; OKADA, 2005). A escolha de *Leuconostoc mesenteroides* como parte da cultura iniciadora selecionada também se deu pela capacidade de essa bactéria reduzir o potencial redox e criar um ambiente favorável para que *Lactobacillus satsumensis* cresça e acidifique a massa. Além disso, estudos apontam a habilidade desta linhagem reduzir o nitrito, auxiliando no desenvolvimento da cor (HUTKINS, 2006a; OH; OH; KIM, 2004).

5.2 Avaliação dos tratamentos de salame tipo italiano

5.2.1 Análises físico-químicas durante a fermentação e maturação

5.2.1.1 Avaliação do pH na fermentação

Na Tabela 1, estão apresentados os valores de pH durante a fermentação dos salames dos tratamentos SCO, SCS e SCC.

Tabela 1 - Média (\pm desvios padrões) dos valores de pH nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de fermentação

Tratamento	Tempo (horas)					
	0	4	8	20	26	34
SCO	5,86 \pm 0,13 ^{dA}	5,78 \pm 0,07 ^{cA}	5,75 \pm 0,06 ^{cA}	5,78 \pm 0,10 ^{cC}	5,64 \pm 0,10 ^{bC}	5,49 \pm 0,12 ^{aB}
SCS	5,85 \pm 0,09 ^{dA}	5,81 \pm 0,08 ^{dA}	5,71 \pm 0,10 ^{cA}	5,64 \pm 0,06 ^{cB}	5,42 \pm 0,09 ^{bB}	5,31 \pm 0,02 ^{aA}
SCC	5,88 \pm 0,12 ^{dA}	5,82 \pm 0,09 ^{dA}	5,71 \pm 0,012 ^{cA}	5,49 \pm 0,08 ^{bA}	5,32 \pm 0,05 ^{aA}	NR

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

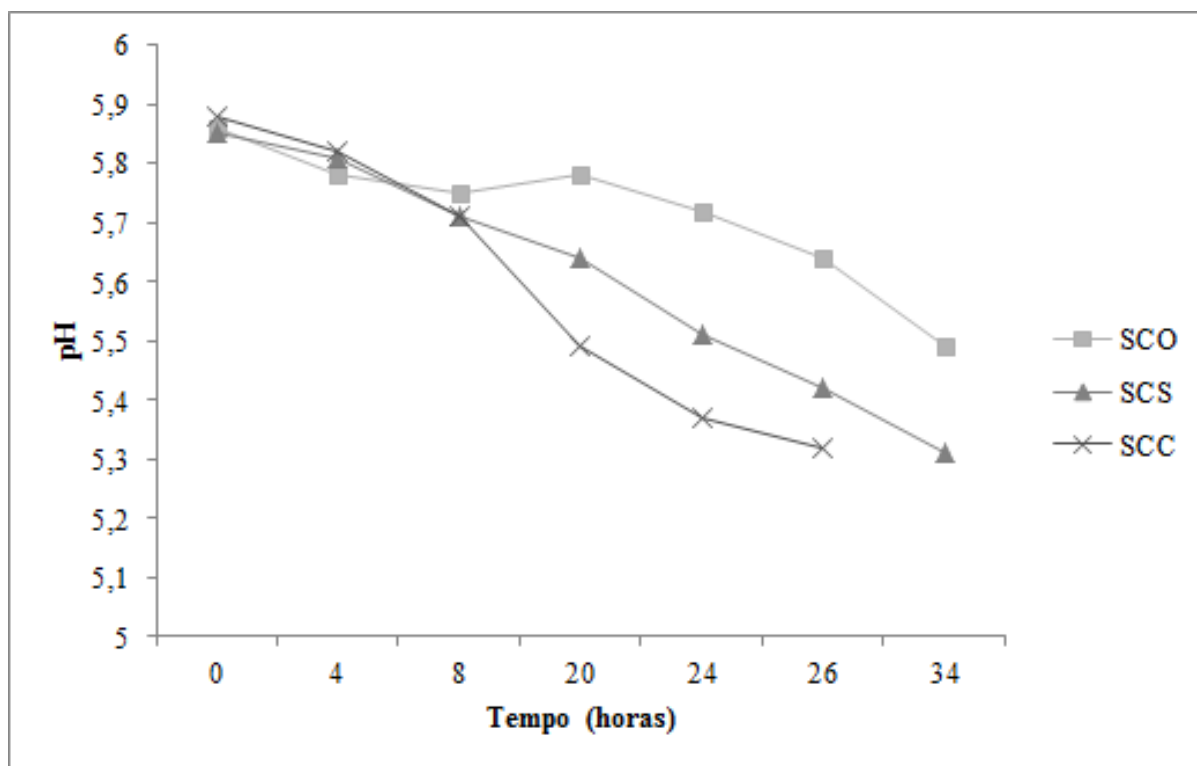
NR: não realizado, pois após 26 horas o tratamento SCC atingiu pH 5,3 e foram transferidos para a câmara de maturação.

No início da fermentação dos salames, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos em relação à queda do pH, provavelmente porque os micro-organismos estavam em fase de adaptação, chamada fase *lag*. Após 4 horas para os salames sem adição de cultura iniciadora (SCO) e 8 horas para os salames elaborados com cultura iniciadora (SCS e SCC), houve a primeira redução significativa ($p \leq 0,05$) do pH em função do tempo de fermentação. Desde então, os salames com a cultura iniciadora selecionada (SCS) permaneceram sem alterações significativas ($p > 0,05$), até o tempo de 20 horas de fermentação, assim como os salames sem adição de cultura iniciadora (SCO). Com 20 horas de fermentação, o tratamento SCC apresentou uma redução considerável do pH, chegando a 5,49, enquanto os outros tratamentos SCO e SCS estavam com pH 5,64 e 5,78, respectivamente.

O tratamento SCC alcançou o pH de 5,3 com 26 horas de fermentação, enquanto o tratamento SCS chegou ao mesmo valor com 34 horas de fermentação. O tratamento SCO terminou a fermentação juntamente com o SCS, porém com o pH igual a 5,49. Este resultado provavelmente está relacionado ao poder de acidificação do *Pediococcus pentosaceus*, presente na cultura comercial utilizada no tratamento SCC.

Na Figura 12, a redução do pH de cada tratamento está evidenciada, através de um gráfico de pH em relação ao tempo de fermentação.

Figura 12 – Redução do pH durante a fermentação dos salames



SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

É notável a diferença na redução do pH entre os tratamentos, sendo que após 20 horas de fermentação, a queda do pH tornou-se mais acentuada para os tratamentos SCS e SCO.

Muthukumarasamy e Holley (2006) encontraram valores aproximados de 5,31, após 24 horas de fermentação, em embutido fermentado adicionado de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus carnosus*. Sameshima *et al.* (1998) estudaram a queda do pH em embutidos fermentados secos adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* e verificaram que, após 24 horas de fermentação, o pH dos embutidos situou-se entre 5,0 e 5,2. Esses valores foram similares aos encontrados no tratamento SCC, porém inferiores aos tratamentos SCO e SCS.

Rubio *et al.* (2013) encontraram valores inferiores de pH em relação aos valores encontrados no presente estudo referentes a produtos cárneos fermentados inoculados de *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e sem inoculação. Ao final de 6 dias de fermentação em temperatura de 20-22°C, os valores de pH foram 4,6, 5,01 e 5,20, respectivamente. No entanto, o tempo de fermentação foi superior ao tempo de fermentação dos tratamentos de salame tipo italiano deste experimento.

Do mesmo modo, um estudo contendo dois tratamentos de linguiça fermentada defumada, um inoculado com *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*, e *Lactobacillus curvatus*, e outro inoculado com *Lactobacillus acidophilus* CCDM 476 e *Bifidobacterium animalis* CCDM 241, alcançaram, após 14 dias de fermentação, pH igual a 5,02 para ambos os tratamentos (HOLKO *et al.*, 2013).

A queda acentuada do pH nos tratamentos adicionados de cultura iniciadora em relação ao tratamento controle também foi relatado por Campagnol *et al.* (2007), que estudaram salames elaborados com *Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de cultura de plasma suíno e sua aplicabilidade em salame. Entretanto, os autores obtiveram maior acidificação no tratamento adicionado de *Lactobacillus plantarum* do que no tratamento elaborado com a cultura iniciadora comercial, diferindo dos resultados apresentados. Em embutidos fermentados secos elaborados com a adição de culturas iniciadoras, a queda do pH é mais rápida e mais pronunciada durante a fermentação (GARDINI *et al.*, 2002).

Os resultados mostraram que a fermentação foi mais eficiente no salame tipo italiano adicionado da cultura iniciadora comercial (SCC), pois se verificou maior velocidade de redução do pH, consequência da produção mais rápida de ácido lático, resultante da metabolização dos carboidratos adicionados à massa cárnea (LÜCKE, 2000).

A cultura comercial, utilizada neste experimento, é uma mistura de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*. *P. pentosaceus* tolera altas concentrações de NaCl (6,5%) e ambientes ácido, sendo bastante utilizada na indústria de embutidos cárneos nos Estados Unidos, pela rápida acidificação em temperaturas de fermentação acima de 30°C, reduzindo o tempo total do processo de 6 para 2 dias (HUTKINS, 2006a; JESSEN, 1995). Já *Lactobacillus satsumensis* é capaz de crescer em caldo MRS, com 5% de NaCl e em pH 3,0, enquanto *Leuconostoc mesenteroides* cresce em ambientes com até 6,5% de NaCl; sendo assim, a cultura iniciadora selecionada também é tolerante ao sal e a ambientes ácido (DIMIC, 2006; ENDO; OKADA, 2005).

Possivelmente a cultura selecionada teve maior dificuldade de adaptação na massa da carne que a cultura comercial, já que a cultura comercial tem um largo histórico de uso como cultura iniciadora em embutidos cárneos fermentados. A adaptação da cultura selecionada de kefir frente à microbiota endógena da carne e às condições ambientais da massa resultaram em um atraso no processo de acidificação em relação ao tratamento com a cultura comercial.

Entretanto, a adição da cultura iniciadora selecionada se mostrou mais vantajosa do que não adicionar uma cultura iniciadora. A cultura iniciadora adicionada na fabricação de embutido fermentado permite que o fabricante conheça melhor o seu produto, pois reduz o tempo de fermentação levando à redução de custos e maior uniformidade do processo e das peças. Além disso, a queda mais rápida do pH durante a fermentação evita que micro-organismos deteriorantes e patogênicos possam se proliferar, garantindo a inocuidade e qualidade do embutido.

5.2.1.2 Avaliação do pH na maturação

Os resultados do pH, ao longo do período de maturação dos salames, estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Médias (\pm desvios padrão) dos valores de pH nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de maturação

Tratamento	Tempo (dias)					
	0	7	14	21	28	31
SCO	5,49 ^{cb}	5,22 \pm 0,06 ^{aA}	5,26 \pm 0,07 ^{abAB}	5,40 \pm 0,12 ^{bcA}	5,58 \pm 0,21 ^{ca}	5,83 \pm 0,38 ^{dAB}
SCS	5,31 ^{bcA}	5,09 \pm 0,13 ^{aA}	5,16 \pm 0,12 ^{abA}	5,29 \pm 0,21 ^{bcA}	5,43 \pm 0,21 ^{ca}	5,70 \pm 0,34 ^{dA}
SCC	5,32 ^{abA}	5,21 \pm 0,10 ^{aA}	5,35 \pm 0,11 ^{abB}	5,45 \pm 0,15 ^{bcA}	5,57 \pm 0,19 ^{ca}	5,88 \pm 0,25 ^{dB}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

O tempo 0 é último resultado do pH no período de fermentação, quando os salames tipo italiano passaram para a câmara de maturação à temperatura controlada em torno de 10°C, e umidade em torno de 90%, até o término do processo de secagem.

Após 7 dias de maturação, todos os tratamentos tiveram redução do pH em relação ao tempo inicial, alcançando valores abaixo de 5,3. A redução do pH foi causada, provavelmente, pela continuidade do processo de fermentação, mesmo que de forma mais lenta, em consequência da temperatura de 10°C, já que as BAL são bactérias mesófilas.

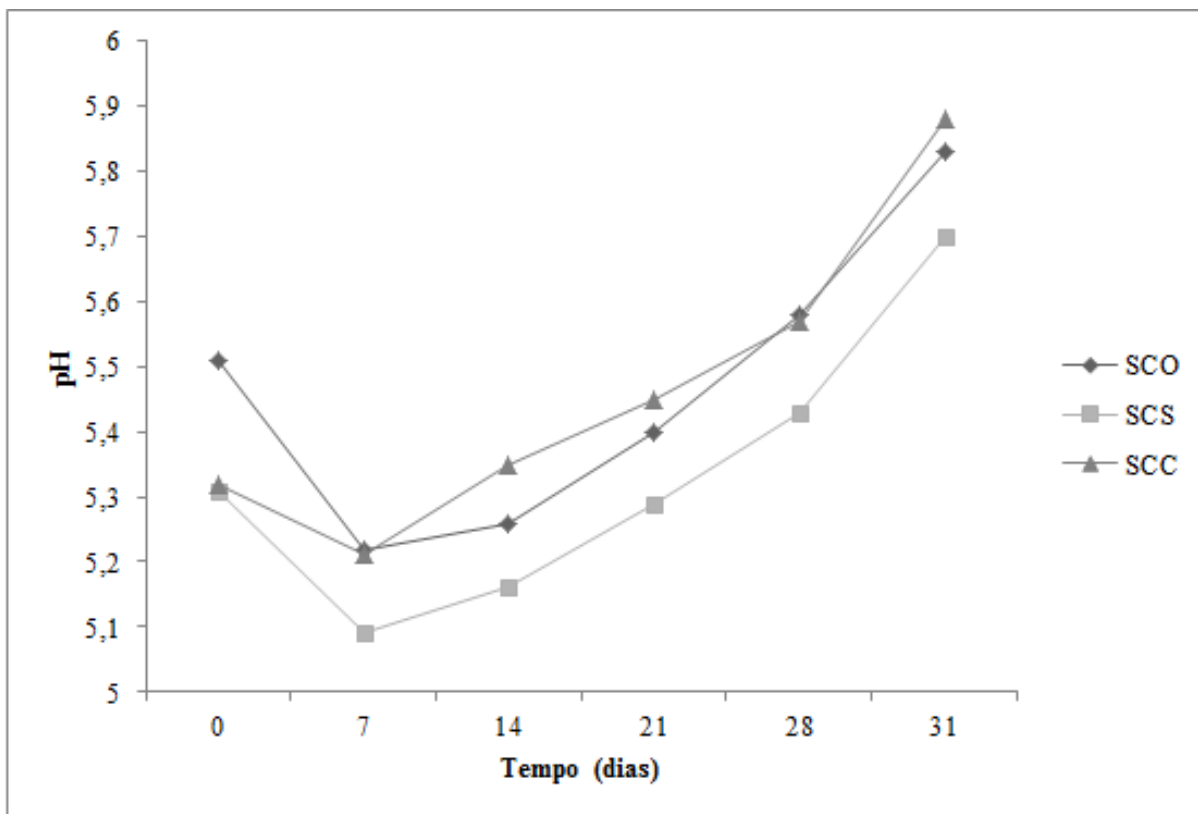
No tratamento SCO, mesmo sem a adição de cultura iniciadora, também ocorreu a redução do pH nos primeiros dias de maturação, possivelmente pela ação das BAL presentes naturalmente na microbiota da carne. O tratamento SCS obteve o menor valor pH (5,09) após 7 dias de maturação, porém os 3 tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$). Após 14 dias de maturação, houve um ligeiro aumento no pH dos tratamentos,

porém os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) com relação aos resultados de 7 dias de maturação. Ainda após 14 dias de maturação, houve diferença ($p\leq 0,05$) entre os salames dos tratamentos SCS e SCC, sendo que para o tratamento SCC observou-se o maior valor de pH dentre os 3 tratamentos (5,35).

Nos tempos subsequentes, 21, 28 e 31 dias de maturação, o pH de todos os tratamentos continuaram aumentando, progressivamente, até o final da maturação. Estudos também relataram o decréscimo do pH durante o período de fermentação e o leve aumento ao final da maturação dos salames utilizando diferentes culturas iniciadoras (MAURIELLO *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2008; ARO-ARO *et al.*, 2010; RUBIO *et al.*, 2013, 2014).

O comportamento do pH de cada tratamento está evidenciado na Figura 13, na qual se observa a variação do pH em relação ao tempo de maturação.

Figura 13 - pH dos salames durante a fermentação e maturação



SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

Mauriello *et al.* (2004) relataram o decréscimo do pH até 5,3 nos primeiros dias de fermentação e o aumento até o final da maturação de embutido fermentado seco, ficando o pH do produto final próximo do valor inicial. O aumento do pH foi atribuído à possível produção de amônia e outros compostos básicos como peptídeos, aminoácidos, aldeídos,

aminas e ácidos graxos livres resultantes da atividade proteolítica. Segundo Grazia *et al.* (1986), o final do período de maturação do salame é caracterizado pela abundante colonização da superfície do salame por fungos, os quais oxidam o lactato e provocam aumento do pH, através da liberação de amônia no produto.

É comum a presença de fungos na superfície de embutidos cárneos fermentados como o salame, principalmente espécies de *Penicillium*. Espécies como *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium camemberti*, e *Penicillium chrysogenum* possuem propriedades desejáveis, promovendo o desenvolvimento de sabor, odor e textura através das proteinases e lipases (HUTKINS, 2006c). Em alguns casos, a proliferação descontrolada de fungos pode causar a contaminação por micotoxinas, além de interferir na qualidade do produto. *Penicillium nalgiovense* e *Penicillium chrysogenum*, obtidas comercialmente, estão sendo usadas na indústria de embutidos cárneos fermentados como culturas protetoras, pois não produzem micotoxinas e impedem o crescimento de fungos patogênicos (BERNÁLDEZ *et al.*, 2013).

Na Figura 14, é possível observar a evolução do crescimento de fungos na superfície dos salames ao longo do período de maturação.

Figura 14 - Colonização de fungos na superfície dos salames tipo italiano ao longo do processo de maturação



Os salames tipo italiano deste estudo apresentaram proliferação de fungos na sua superfície, aumentando, gradativamente, com o passar dos dias de maturação.

No último dia de maturação, os valores de pH mais baixos foram observados nos salames pertencentes ao tratamento SCS, com pH igual a 5,70, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos tratamentos SCO e SCC, que apresentaram valores de pH 5,83 e 5,88, respectivamente. Os micro-organismos presentes nos tratamentos SCO e SCC podem ter

apresentado maior atividade proteolítica, o que causou maior aumento do pH, comparado ao tratamento SCS.

Aro-Aro *et al.* (2010) realizaram um ensaio para testar o efeito de diferentes culturas iniciadoras comerciais na mudança do perfil proteico de embutidos fermentados. O estudo concluiu que nos embutidos inoculados com *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus* houve maior degradação de proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, enquanto em embutidos inoculados apenas com *S. xylosus* ocorreu aumento do conteúdo de aminoácidos livres, no final do processo de maturação, atribuídos à atividade proteolítica das culturas iniciadoras.

Macedo *et al.* (2008) verificaram a influência da utilização de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* sobre as características físico-químicas e sensoriais de embutidos fermentados com cultura comercial T-SPX (Chr. Hansen A/S, Hørsholm, Dinamarca), uma cultura mista de *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus xylosus*, bem como o desenvolvimento e a viabilidade das culturas no produto cárneo. Os embutidos adicionados de *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* mostraram valores de pH de 4,48, 4,42 e 4,40, no terceiro dia de fermentação, a 25°C, respectivamente. Os autores relataram que, a partir do sétimo dia de fabricação, o pH do tratamento controle, adicionado apenas de *P. pentosaceus* e *S. xylosus*, sofreu ligeiro aumento, mantendo-se próximo a 5,0 até o final da maturação, enquanto os valores de pH dos embutidos com culturas probióticas sofreram pequenas oscilações ao longo dos 25 dias de processamento, variando entre 4,55 e 4,24. Esses valores são inferiores aos valores dos tratamentos deste experimento.

Em estudo sobre a caracterização de embutidos tradicionais da Grécia, os pesquisadores tiveram variações de pH entre 4,67 e 6,09 (AMBROSIADIS *et al.*, 2004). Segundo Kim *et al.* (2012), o embutido fermentado seco tradicional apresenta pH final entre 4,8 e 6,2. O pH dos salames tipo italiano se encontra dentro desta variação, considerado normal para salames tradicionais segundo os autores. A acidificação excessiva pode causar defeitos de coloração e formação de gás, sendo estes os principais problemas de embutidos cárneos fermentados (BUCKENHÜSKES, 1993). É comum, durante a fermentação, ocorrer a redução do pH para valores abaixo de 5,3 e, ao longo da maturação, com a presença de fungos, bolores e a ação proteolítica das culturas iniciadoras, o pH do produto aumentar (AMMOR; MAYO, 2007).

Em alguns países, o valor do pH dos embutidos é um dos critérios utilizados para o controle de sua qualidade, entretanto, no Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade e

Qualidade de Salame (BRASIL, 2000) não utiliza o valor do pH como parâmetro de controle (SANTA, 2008).

5.2.1.3 Avaliação da perda de peso na fermentação e maturação

Na Tabela 3, estão relacionados os valores de perda de peso dos salames tipo italiano em função do tempo de fermentação e maturação.

Tabela 3 - Médias (\pm desvios padrão) dos valores das perdas de peso (%) nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de fermentação e maturação

	Tempo	Tratamentos		
		SCO	SCS	SCC
Fermentação	24 horas	2,55 \pm 0,76 ^{aF}	3,05 \pm 1,33 ^{aF}	2,89 \pm 1,71 ^{aF}
	48 horas	6,61 \pm 1,34 ^{aE}	7,64 \pm 2,63 ^{aE}	6,37 \pm 3,15 ^{aE}
Maturação	7 dias	19,43 \pm 2,52 ^{aD}	21,83 \pm 2,48 ^{aD}	20,36 \pm 3,80 ^{aD}
	14 dias	28,23 \pm 5,2 ^{bC}	31,47 \pm 2,67 ^{aC}	30,95 \pm 3,06 ^{abC}
	21 dias	36,01 \pm 7,23 ^{aB}	37,54 \pm 4,59 ^{aB}	37,71 \pm 7,13 ^{aB}
	28 dias	40,81 \pm 6,62 ^{aA}	41,72 \pm 4,34 ^{aA}	42,14 \pm 6,14 ^{aA}
	31 dias	42,54 \pm 6,99 ^{bA}	43,73 \pm 4,81 ^{aA}	43,90 \pm 6,38 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

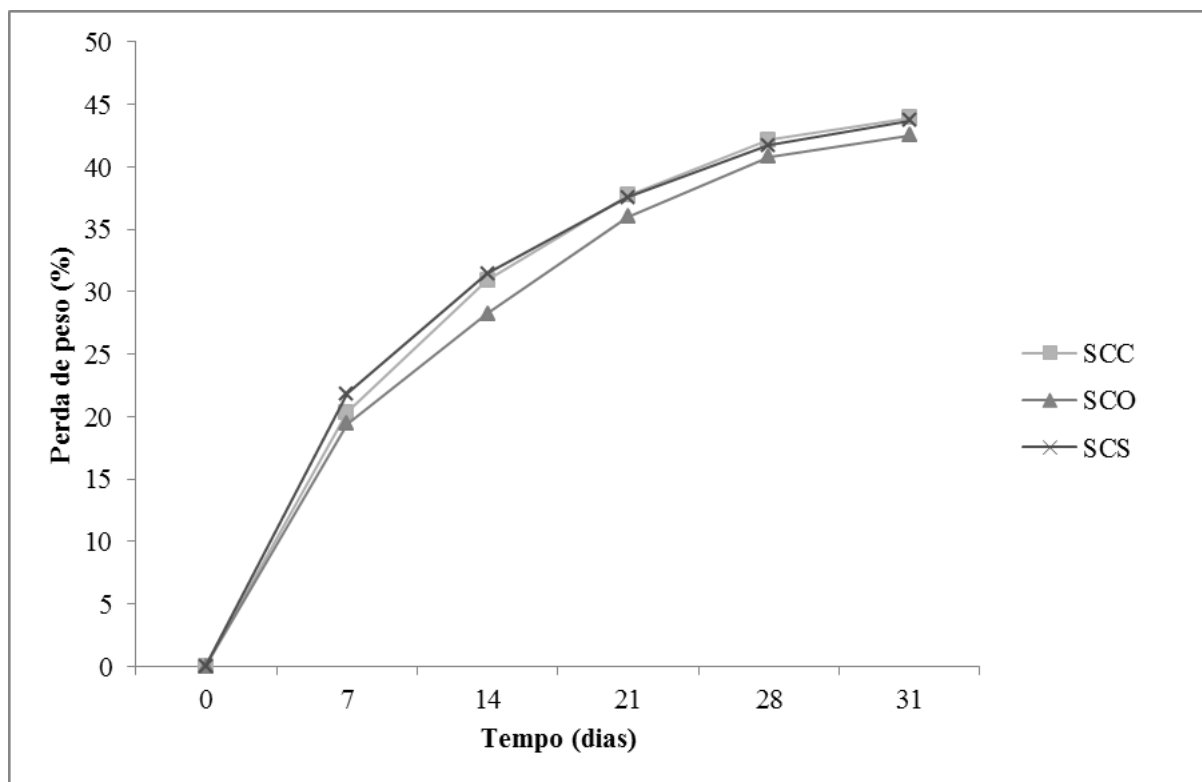
SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

Analisando os dados de perda de peso, observa-se que houve efeito significativo do tratamento ($p \leq 0,05$) e tempo de maturação ($p \leq 0,05$), porém não houve efeito de interação do tratamento x tempo de maturação ($p > 0,05$), exceto para o tempo de 14 dias de maturação, no qual a perda de peso do tratamento SCO foi estatisticamente inferior ao tratamento SCS.

Os resultados apontam que o maior decréscimo de peso ocorreu nos primeiros 7 dias de maturação dos salames, visualizado na Figura 15, visto que os salames perderam, aproximadamente, 43,9% do valor total do peso perdido, ao final da maturação. Ao final do período de secagem dos salames, observaram-se valores de 43,90%, 43,73% e 42,54% para os tratamentos SCC, SCS e SCO, respectivamente. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, sendo relacionada a perda de peso aos valores de pH, sendo visto que, quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas (5,2-5,3), ocorre uma diminuição na capacidade de retenção de água (MAURIELLO *et al.*, 2004).

A Figura 15 apresenta a perda de peso dos salames, durante o processo de fermentação e maturação dos salames.

Figura 15 - Perda de peso (%) dos salames de cada tratamento



SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

Os resultados da perda de peso ficaram com o valor um pouco acima da faixa de 30 a 40%, considerada ideal para os produtos fermentados secos (RUST, 1994). Valores semelhantes foram encontrados por Cirolini *et al.* (2010), no processamento de salames tipo italiano, com a média da perda de peso em torno de 43,26%.

Resultados similares também foram relatados por Garcia, Gagleazzi e Sobral (2000), que obtiveram perda de peso de 44% de salames tipo italiano sem adição de cultura iniciadora. Erkkilä *et al.* (2001) obtiveram perda de peso de 40%, ao final da maturação de linguiças, fermentadas por culturas de *Lactobacillus rhamnosus* e no tratamento controle, fermentado por *Pediococcus pentosaceus*.

Macedo *et al.* (2008) obtiveram valores entre 29,94 e 33,84 em salames adicionados de *Lactobacillus* probióticos, inferiores aos resultados encontrados nos tratamentos SCC, SCS e SCO. Campagnol *et al.* (2007) relataram 60% de perda de peso em salames sem toucinho na formulação, ou seja, valor bem acima do considerado ideal. A redução da quantidade de água dos salames é um dos principais fatores responsáveis pela textura e sabor do produto final (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000).

Assim que finalizado o período de maturação dos salames, os mesmos foram armazenados em embalagem a vácuo, impedindo trocas gasosas com o exterior e, por isso, a perda de peso não foi determinada durante o armazenamento.

5.2.1.4 Determinação da atividade de água (Aw) na fermentação e maturação

Na Tabela 4, estão relacionados os valores de Aw dos salames tipo italiano em função do tempo de fermentação e maturação.

Tabela 4 - Média (\pm desvios padrões) dos valores de atividade de água (Aw) nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de fermentação e maturação.

	Tempo	Tratamentos		
		SCO	SCS	SCC
Fermentação	0 hora	0,972 \pm 0,01 ^{aF}	0,971 \pm 0,01 ^{aE}	0,970 \pm 0,01 ^{aE}
	24 horas	0,962 \pm 0,01 ^{aE}	0,967 \pm 0,01 ^{aE}	0,968 \pm 0,01 ^{aE}
	48 horas	0,962 \pm 0,01 ^{aE}	0,962 \pm 0,01 ^{aE}	0,962 \pm 0,01 ^{aE}
Maturação	7 dias	0,958 \pm 0,010 ^{aE}	0,953 \pm 0,007 ^{aD}	0,951 \pm 0,004 ^{aD}
	14 dias	0,944 \pm 0,009 ^{aD}	0,939 \pm 0,005 ^{aD}	0,939 \pm 0,003 ^{aD}
	21 dias	0,927 \pm 0,004 ^{aC}	0,924 \pm 0,008 ^{aC}	0,927 \pm 0,007 ^{aC}
	28 dias	0,911 \pm 0,012 ^{aB}	0,909 \pm 0,008 ^{aB}	0,902 \pm 0,009 ^{aB}
	31 dias	0,887 \pm 0,04 ^{aA}	0,893 \pm 0,02 ^{aA}	0,891 \pm 0,03 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

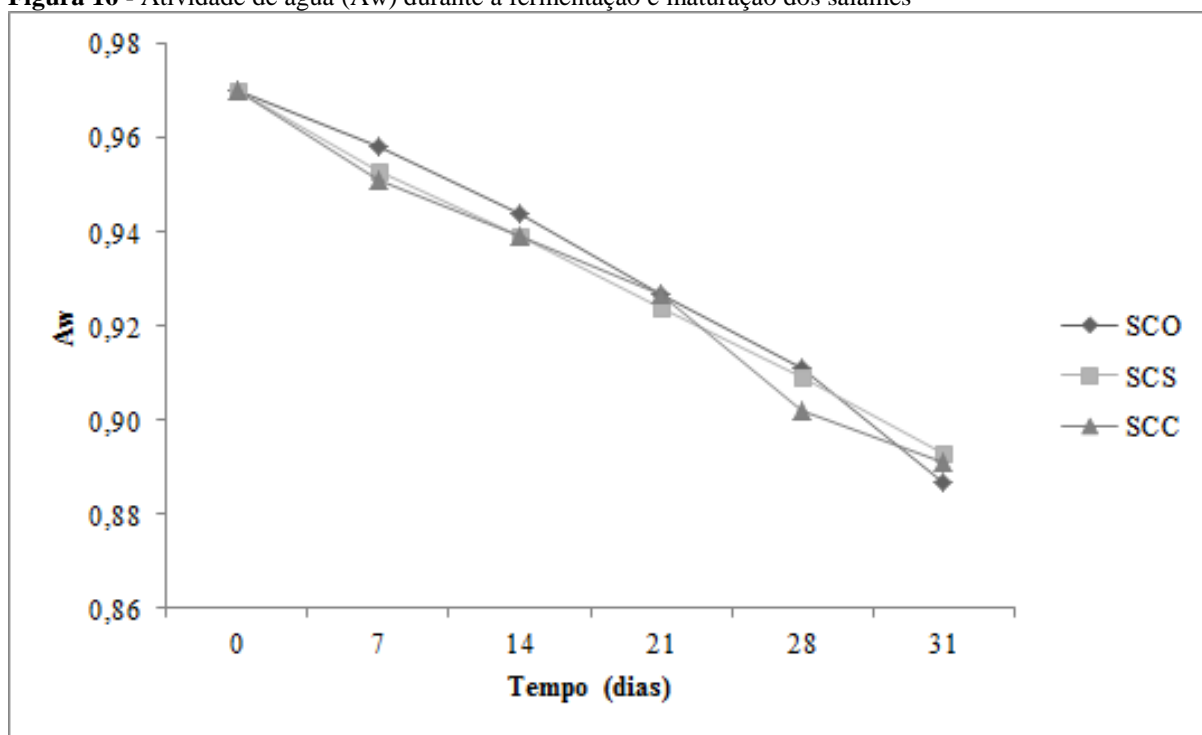
SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

Pode-se observar pela análise dos dados de atividade de água (Aw), que houve efeito significativo do tratamento ($p \leq 0,05$) e tempo de maturação ($p \leq 0,05$), porém não houve efeito de interação do tratamento x tempo de maturação ($p > 0,05$), assim como observado na análise de perda de peso.

A atividade de água das massas dos tratamentos apresentou valores em torno de 0,97, e, ao longo do período de fermentação e secagem, alcançaram, gradativamente, valores de 0,887, 0,893 e 0,891 nos tratamentos SCO, SCS e SCC, respectivamente. Os três tratamentos obtiveram valores de atividade de água inferiores ao nível máximo de 0,90, recomendado pela legislação brasileira para salame tipo italiano (BRASIL, 2000).

A Figura 16 apresenta o gráfico da redução da Aw em função do tempo (dias), durante os processos de fermentação e maturação.

Figura 16 - Atividade de água (A_w) durante a fermentação e maturação dos salames



SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

Observando-se a Figura 16, verifica-se que a redução da A_w dos tratamentos se comportou de maneira similar e com valores semelhantes.

Rubio *et al.* (2013) encontraram valores iniciais de atividade de água semelhantes em embutidos fermentados secos inoculados com linhagens probióticas, variando entre 0,97 - 0,91, ao final da maturação, sendo os valores finais acima dos valores encontrados nos 3 tratamentos deste experimento.

Holko *et al.* (2013) obtiveram resultados similares de atividade de água em embutidos fermentados fabricados com carne de cordeiro, com o valor inicial de 0,97 e final de 0,88. Outras pesquisas também descreveram resultados semelhantes aos encontrados nos tratamentos SCO, SCS e SCC (MUTHUKUMARASAMY; HOLLEY, 2006; MACEDO *et al.*, 2008; RUBIO *et al.*, 2014).

De acordo com Leistner e Roedel (1975 citado por AMBROSIADIS *et al.*, 2004), os produtos cárneos são caracterizados como perecíveis, semi-perecíveis e não perecíveis, baseados nos valores de pH e atividade de água. Os produtos perecíveis possuem $pH > 5,2$ e $A_w > 0,95$, e devem ser armazenados à temperatura abaixo de 5°C. Os produtos semi-perecíveis possuem pH entre 5,2-5,0 e/ou A_w entre 0,95-0,91, e devem ser armazenados à temperatura abaixo de 10°C. Os produtos não perecíveis possuem $pH < 5,2$ e $A_w < 0,95$, ou apenas $pH < 5,0$ ou $A_w < 0,91$, sendo que não necessitam de refrigeração. Os três tratamentos

do experimento são caracterizados como não perecíveis, podendo ser armazenados à temperatura ambiente.

A redução no teor de água torna o ambiente desfavorável ao crescimento e à multiplicação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos (MACEDO *et al.*, 2008).

5.2.2 Análises físico-químicas durante o armazenamento

5.2.2.1 Avaliação do pH no armazenamento

Na Tabela 5, estão apresentados os valores de pH dos salames tipo italiano em função do tempo de armazenamento.

Tabela 5 - Médias (\pm desvios padrão) dos valores de pH nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento

Tratamentos	Tempo de Armazenamento (dias)		
	0	15	30
SCO	6,08 \pm 0,06 ^{aB}	6,09 \pm 0,12 ^{aA}	6,05 \pm 0,08 ^{aA}
SCS	5,84 \pm 0,24 ^{aA}	6,03 \pm 0,15 ^{bA}	6,06 \pm 0,09 ^{bA}
SCC	5,94 \pm 0,13 ^{aAB}	6,11 \pm 0,13 ^{bA}	6,01 \pm 0,07 ^{abA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

Apenas o tratamento SCO não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de pH, ao longo do período de armazenamento de até 30 dias, permanecendo com uma média de 6,07. Entretanto, o dia 0 foi o único tempo em que os tratamentos se diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) entre si, sendo que o tratamento SCS obteve o menor valor de pH (5,84), seguido do tratamento SCC (5,94) que não se diferenciou do SCS e do SCO, e o SCO com o maior valor de pH (6,08).

O tratamento SCS obteve seu menor valor de pH no dia 0 de armazenamento com 5,84, e nos tempos consecutivos aumentou gradativamente para 6,03, após 15 dias, e 6,06, após 30 dias de armazenamento, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) entre os tempos 15 e 30 dias. O tratamento SCC não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos 0 e 30 dias, porém, com 15 dias de armazenamento, houve um aumento significativo ($p \leq 0,05$) do pH, alcançando 6,11, e voltando a diminuir no tempo seguinte.

Os resultados finais de pH variaram entre 6,01 e 6,06, valores superiores aos obtidos por Ruiz (2011) para salames tipo italiano adicionados de probióticos encapsulados. Após 150 dias de estocagem, os valores de pH variaram entre 5,0 e 5,7.

Bozkurt e Erkmen (2002) obtiveram leve do pH ao longo do armazenamento, com ligeiras quedas em alguns momentos para embutidos fermentados tipicamente turcos, assim como no tratamento SCC. O pH final, após 60 dias de armazenamento, não ultrapassou 5,5 para nenhum de seus tratamentos. Os autores atribuem o aumento do pH durante a estocagem dos embutidos a alguns aditivos utilizados no processamento, os quais possuem capacidade de agir como um tampão nos ácidos orgânicos, principalmente os fosfatos.

Wójciak *et al.* (2012) avaliaram o pH de embutidos fermentados secos adicionados de linhagens probióticas de *Lactobacillus casei*, durante o armazenamento por 6 meses, a 4°C. As amostras não ultrapassaram valores de pH 5,0 até o final do período de estocagem, valores inferiores aos encontrados nos tratamentos SCO, SCS e SCC. Entretanto, os autores também relataram um acréscimo nos valores de pH ao longo do tempo.

Kim *et al.* (2012) obtiveram resultados similares em embutidos fermentados secos irradiados, com pH em torno de 5,0, ao final do período de 90 dias de estocagem, a 4°C. A estocagem feita em temperatura de refrigeração auxilia a manutenção da estabilidade do produto, o que não ocorreu no presente estudo, já que o armazenamento foi feito a 20°C.

O aumento o pH pode ser devido às reações de descarboxilação e desaminação de aminoácidos que liberam amônia. Por outro lado, o pH pode sofrer nova redução, pela presença de ácidos graxos livres no meio, resultado da ocorrência de lipólise (MACEDO *et al.*, 2008). Este fenômeno pode explicar o que aconteceu com os tratamentos SCC. A produção de proteinases e lipases está relacionada com a aumento e queda do pH, durante o período de estocagem, porém são importantes por influenciarem o desenvolvimento de compostos aromáticos (FERNANDEZ *et al.*, 2000; FIORENTINI *et al.*, 2009). A cultura iniciadora comercial é mais lipolítica e proteolítica que a cultura utilizada no tratamento SCS, contendo apenas BAL, devido à presença do *Staphylococcus xylosum*. Esta espécie está presente, naturalmente, na microbiota da carne, mas provavelmente se desenvolve melhor quando adicionada como cultura iniciadora, exercendo funções tecnológicas (FIORENTINI *et al.*, 2009).

Apesar de os valores de pH se apresentarem mais elevados do que os valores relatados na literatura, o embutido fermentado seco possui pH final entre 4,8 e 6,2. Os 3

tratamentos (SCO, SCS e SCC) mantiveram seus valores de pH dentro dos valores recomendados para salame (KIM *et al.*, 2012).

5.2.2.2 Determinação da atividade de água (Aw) no armazenamento

Os resultados de Aw do dia 0 são diferentes do dia 31 de maturação, pois novas medidas em outras peças de salame foram realizadas no laboratório, assim como o pH.

Na Tabela 6, estão apresentados os valores de Aw dos salames tipo italiano em função do tempo de armazenamento.

Tabela 6 - Médias (\pm desvios padrão) dos valores de atividade de água (Aw) nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento.

Tratamento	Tempo de Armazenamento (dias)		
	0	15	30
SCO	0,880 \pm 0,04 ^{aA}	0,885 \pm 0,04 ^{aA}	0,888 \pm 0,03 ^{aB}
SCS	0,887 \pm 0,02 ^{aA}	0,878 \pm 0,02 ^{aA}	0,882 \pm 0,02 ^{aAB}
SCC	0,889 \pm 0,04 ^{bA}	0,883 \pm 0,04 ^{abA}	0,872 \pm 0,03 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

De acordo com os resultados apresentados, todos os tratamentos ao longo do período de armazenamento obtiveram valores de Aw menores que 0,90, ou seja, dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira para salames tipo italiano (BRASIL, 2000).

Os tratamentos SCO e SCS não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento. O mesmo não pode ser observado no tratamento SCC, que apresentou redução da Aw, após 30 dias de estocagem, com o valor de 0,872, mostrando-se diferente estatisticamente ($p \leq 0,05$) apenas do tempo 0, o qual obteve 0,889 de Aw.

Entre os tratamentos houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) somente após 30 dias de armazenamento. O tratamento SCC obteve valor de Aw mais baixo que os demais, diferindo apenas do tratamento SCO, com o resultado de 0,888. O tratamento SCS foi igual estatisticamente ($p \leq 0,05$) aos outros tratamentos.

Ruiz (2011) obteve valores similares, relatando Aw inferior a 0,90, ao longo de todo o período de estocagem de 150 dias. Triki *et al.* (2013) avaliaram a Aw de embutidos fermentados secos contendo baixo teor de gordura, durante 61 dias de armazenamento. Os

valores foram similares e variaram entre 0,872 e 0,896, sem alterações ao longo do tempo. Tabanelli *et al.* (2013) também não obtiveram mudanças na Aw, durante o período de estocagem de embutidos fermentados secos, que permaneceram abaixo de 0,90.

A Aw abaixo de 0,90 é suficiente para garantir segurança sanitária de produtos cárneos fermentados como o salame (WÓJCIAK *et al.*, 2012). Mesmo havendo algumas diferenças estatísticas nos valores de atividade de água para o tratamento SCC, estes resultados podem ter relação com as variações sofridas pelas amostras durante o período de fermentação e maturação, como por exemplo, posição da amostra no interior da câmara de fermentação e secagem e variação da umidade e temperatura no interior das câmaras.

5.2.2.3 Determinação de cor

No final do período de maturação, foi feito o acompanhamento da cor das amostras de salame, por meio de um colorímetro, ao longo do período de armazenamento.

Na Tabela 7, estão apresentados os resultados para o parâmetro L* dos salames tipo italiano, em função do tempo de armazenamento.

Tabela 7 - Médias (\pm desvios padrão) dos valores de L* nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento.

Tratamento	Tempo de Armazenamento (dias)		
	0	15	30
SCO	45,41 \pm 5,83 ^{aA}	45,23 \pm 6,79 ^{aA}	45,94 \pm 4,42 ^{aA}
SCS	45,85 \pm 2,30 ^{aA}	46,24 \pm 4,26 ^{aA}	45,53 \pm 5,06 ^{aA}
SCC	46,08 \pm 3,94 ^{aA}	45,56 \pm 4,59 ^{aA}	45,51 \pm 4,02 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial. L*: referente à luminosidade.

De acordo com a análise dos valores de L*, referente à luminosidade, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), até 30 dias de armazenamento, para os 3 tratamentos, assim como também não foi constatada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos ao longo do tempo. A média para o valor de L* dos tratamentos foi de 45,70.

Os valores de L* apresentados neste experimento estão acima dos valores encontrados por Garcia, Gagleazzi e Sobral (2000), que obtiveram o valor de 36, ao final do período de maturação de salames tipo italiano. Campagnol *et al.* (2007) também obtiveram valores inferiores aos relatados neste experimento para L*, ao final do processo de secagem,

variando entre 37,22 e 38,70. Esses valores estão relacionados à perda de peso excessiva apontada no trabalho, acima do recomendado de no máximo 40%, causando o escurecimento dos salames.

Cavenaghi e Oliveira (1999 citado por GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000) encontraram resultados similares em salames tipo italiano de seis marcas comerciais diferentes, com os valores variando entre 47,6 e 49,6 para L*.

Cirolini *et al.* (2010) obtiveram valores que variaram entre 41,51 e 44,90, em salames tratados com diferentes culturas iniciadoras, contendo sempre uma espécie de BAL mais uma espécie de *Staphylococcus*.

Hoz *et al.* (2004) analisaram a cor de embutidos fermentados típicos espanhol e constataram resultados semelhantes para L*, ao final da maturação, com média em torno de 45,6. Os autores observaram que, após um período de 24 horas de exposição, esse valor caiu para uma média de 38,3 em todos os tratamentos contendo óleos vegetais como substitutos de gordura de porco. Este fato foi explicado pela perda de água na superfície e pelo processo de oxidação, mostrando que a quantidade de água do produto interfere na sua luminosidade.

Ruiz (2011) obteve valores constantes durante o período de armazenamento de 150 dias, com valores entre 41,1 e 44,7, que corroboram com os dados deste estudo, com leve redução após 30 dias de armazenamento e posterior aumento no 60º dia para alguns tratamentos, provavelmente decorrente da heterogeneidade do produto, porém sem diferença significativa.

Normalmente, a luminosidade diminui ao longo do período de estocagem, fato este que não aconteceu durante os 30 dias de armazenamento dos tratamentos SCO, SCS e SCC, mas que pode ser observado em um estudo com embutidos fermentados irradiados com diferentes doses e sem irradiação (KIM *et al.*, 2012). Apesar da variação dos resultados encontrados na literatura, os resultados desse experimento para o parâmetro L* corroboram com a maioria deles.

Na Tabela 8, estão apresentados os resultados para o parâmetro a* dos salames tipo italiano, em função do tempo de armazenamento. Os resultados de a* são referentes à intensidade da cor vermelha nas amostras de salame.

Tabela 8 - Médias (\pm desvios padrão) dos valores de a^* nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento.

Tratamento	Tempo de Armazenamento (dias)		
	0	15	30
SCO	9,15 \pm 0,80 ^{aA}	9,43 \pm 0,61 ^{ab}	9,70 \pm 1,00 ^{aA}
SCS	9,19 \pm 0,74 ^{abA}	8,52 \pm 0,42 ^{aA}	9,81 \pm 0,92 ^{bA}
SCC	9,20 \pm 0,58 ^{aA}	9,08 \pm 0,50 ^{aAB}	9,14 \pm 0,55 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial. a^* : referente à intensidade da cor vermelha.

De acordo com os resultados expostos na tabela acima, não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), até 30 dias de armazenamento, para os tratamentos SCO e SCC. No tratamento SCS foi constatada diferença significativa ($p \leq 0,05$), ao longo do tempo, com a diminuição seguida do aumento do valor de a^* entre 15 e 30 dias de armazenamento. Entre os tratamentos não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos tempos 0 e 30 dias, porém após 15 dias de armazenamento, o tratamento SCS mostrou-se diferente estatisticamente ($p \leq 0,05$) do tratamento SCO, que apresentou valor maior. Os resultados dos tratamentos variaram entre 8,52 e 9,81.

Ruiz (2011) relatou em seu trabalho a redução do valor de a^* para alguns tratamentos de salame tipo italiano após 30 e 60 dias de estocagem. A pesquisa atribuiu o ocorrido ao efeito do ácido láctico nos diferentes estágios químicos da mioglobina (mioglobina, nitrosomioglobina e oximioglobina), pois este ácido pode desnaturar parcial ou totalmente o grupo prostético heme. A oxidação do pigmento nitrosomioglobina resulta em metamioglobina, reduzindo a intensidade da cor (WÓJCIAK *et al.*, 2012). Essa teoria pode explicar a queda no valor de a^* no tempo 15 dias para o tratamento SCS, já que este tratamento atingiu os menores valores numéricos de pH, conseqüentemente ocorreu maior produção de ácido láctico.

Os resultados deste experimento foram ligeiramente inferiores aos demonstrados em outros trabalhos que avaliaram o mesmo parâmetro em embutidos fermentados. Kim *et al.* (2012), obtiveram valores entre 11,20 no primeiro dia de estocagem, e 13,07 após 90 dias de estocagem, sendo que o armazenamento aumentou a intensidade do vermelho. Cavenaghi e Oliveira (1999 citado por GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000) apresentaram resultados similares ao trabalho anterior, com valores de a^* entre 11,6 e 15,5. Valores ainda maiores foram relatados na literatura, chegando a 20,2 (CASABURI *et al.*, 2007; CIROLINI *et al.*, 2010; GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000; RUIZ, 2011). Esses últimos trabalhos

citados, em sua maioria, incluíram carne bovina na formulação do embutido. Sabe-se que a cor está diretamente relacionada à quantidade de hemoglobina e mioglobina da carne, que varia entre espécies, músculo, idade, sexo, fatores ambientais, dieta do animal e genética (LIVINGSTON; BROWN, 1981). A carne bovina, por sua vez, possui, naturalmente, coloração mais avermelhada do que a carne suína, fato este, que pode ter influenciado a intensidade da cor vermelha.

Wójciak *et al.* (2012) apresentaram valores similares para o parâmetro a^* em embutidos fermentados secos inoculados com *Lactobacillus casei*, sendo que seu tratamento controle apresentou maior valor, no primeiro dia de armazenamento (9,30). Com o tempo de estocagem, os valores sofreram uma leve queda, sem se diferenciarem significativamente. Nobile *et al.* (2009) também apresentaram resultados semelhantes em salames tipo italiano formulados com substitutos de gordura, sendo que os valores variaram entre os tratamentos entre 8,44 e 10,13.

O pigmento nitrosomioglobina é formado a partir da reação da mioglobina com o óxido nítrico, resultado da redução do nitrito, e é responsável pela cor vermelha do salame (GAO; LI; LIU, 2014). Espécies de *Staphylococcus*, normalmente, são adicionadas para que ocorra a formação desse pigmento estável, porém as culturas iniciadoras adicionadas ou não aos tratamentos demonstraram influência no desenvolvimento de cor, com poucas variações até 30 dias de estocagem. Houve o desenvolvimento da cor vermelha ao longo da fermentação e maturação de todos os tratamentos, possivelmente pela microbiota endógena da carne e através da cultura iniciadora adicionada. A condição ácida dos salames e a capacidade de algumas linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* em reduzir o nitrito também contribuíram para o desenvolvimento da cor característica do tratamento SCS.

Na Tabela 9, estão apresentados os resultados para o parâmetro b^* dos salames tipo italiano, em função do tempo de armazenamento.

Tabela 9 - Médias (\pm desvios padrão) dos valores de b^* nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento

Tratamento	Tempo de Armazenamento (dias)		
	0	15	30
SCO	4,53 \pm 0,71 ^{aA}	4,57 \pm 1,21 ^{aA}	4,86 \pm 1,43 ^{aA}
SCS	4,44 \pm 0,55 ^{abA}	4,26 \pm 0,80 ^{aA}	5,02 \pm 0,37 ^{bA}
SCC	4,59 \pm 0,92 ^{aA}	4,47 \pm 0,69 ^{aA}	4,63 \pm 0,96 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial. b^* : referente à intensidade de cor amarela.

Para o índice de cor amarela não houve diferença significativa ($p > 0,05$), até 30 dias de armazenamento para o tratamento SCO, apresentando valores entre 4,53 e 4,86; e para o tratamento SCC, com valores entre 4,47 e 4,63. Para o tratamento SCS foi constatada diferença significativa ($p \leq 0,05$), no tempo 30 dias em relação ao tempo de 15 dias de armazenamento, apresentando um acréscimo no valor de b^* de 4,26 para 5,02. Apesar de não apresentarem diferença significativa, os tratamentos SCO e SCC também obtiveram um ligeiro aumento numérico, após 30 dias de estocagem para o parâmetro b^* .

Entre os tratamentos não houve diferença significativa ($p > 0,05$) durante o período de armazenamento, com a média dos valores de 4,52, 4,43 e 4,83 para os tempos 0, 15 e 30 dias, respectivamente. O leve aumento nos valores de b^* após 30 dias de estocagem, provavelmente se deve a oxidação lipídica, que eleva a intensidade do amarelo através da rancidez (RUIZ, 2011).

Nobile *et al.* (2009) apresentaram resultados similares, em salames tipo italiano elaborados com substitutos de gordura de porco, com valores entre 3,46 e 4,91 para b^* . Segundo os autores, os resultados não demonstraram grandes evidências da influência da substituição da gordura de porco nos parâmetros de cor, provavelmente devido à heterogeneidade típica na coloração desses produtos.

Os valores obtidos para os tratamentos SCO, SCS e SCC são relativamente inferiores aos resultados encontrados em diversos trabalhos, nos quais é possível observar uma variação grande dos resultados. Campagnol *et al.* (2007) analisaram os valores de b^* para salames sem cultura iniciadora adicionada e salames com a adição de cultura iniciadora, sendo que o primeiro obteve 7,88 e o segundo 7,49 para o parâmetro b^* , sem apresentar diferença estatística. GAO, LI e LIU (2014) obtiveram resultados semelhantes ao trabalho citado, anteriormente, em embutidos fermentados adicionados de *L. casei* C2, relatando

valores entre 6,85 e 7,08. Casaburi *et al.* (2007) relataram valores ainda maiores de b^* para embutidos fermentados secos, alcançando 17,82 ao final do período de secagem.

Wójciak *et al.* (2012) obtiveram estabilidade da cor durante o período de armazenamento para embutidos fermentados secos embalados a vácuo, mostrando a importância da embalagem na estabilidade do produto. A formação e estabilidade da cor são parâmetros importantes para a aceitabilidade do salame (GAO; LI; LIU, 2014).

Na Figura 17, nota-se a evolução da cor dos salames pertencentes aos 3 tratamentos ao longo do período de armazenamento.

Figura 17 - Evolução dos salames ao longo do período de armazenamento



Os salames estão dispostos da esquerda para a direita em SCO, SCC e SCS. (1) após 0 dias de armazenamento; (2) após 30 dias de armazenamento e; (3) após 60 dias de armazenamento.

Desde o tempo 0 até o tempo de 30 dias de armazenamento, não ocorreram alterações visíveis na coloração dos tratamentos, porém após 60 dias de armazenamento, observa-se elevado grau de rancidez em todos os tratamentos, principalmente nos tratamentos SCO e SCS. O tratamento SCC conseguiu manter a cor vermelha mais estável, após 60 dias de estocagem, enquanto os outros tratamentos mostram-se com uma coloração mais marrom. As análises não prosseguiram porque as amostras não apresentavam, após 60 dias de estocagem, aparência e odores característicos de salame.

Na Figura 18 é possível visualizar a rancidez na superfície da amostra do tratamento SCS.

Figura 18 - Salame tipo Italiano do tratamento SCS após 60 dias de armazenamento



A rancidez é um problema característico do uso apenas de BAL como cultura iniciadora, já que elas são capazes de produzir peróxido de hidrogênio, acelerando os processos de oxidação lipídica e a descoloração do salame, tornando-os amarronzados pela formação de metamioglobina (GAO; LI; LIU, 2014).

A adição de uma espécie de *Staphylococcus* coagulase negativa pode degradar o peróxido de hidrogênio formado pelas BAL através da enzima catalase, manter a coloração vermelha por mais tempo pela ação das enzimas nitrato e nitrito redutase, além de evitar processos oxidativos, como no caso do tratamento SCC.

5.2.2.4 Determinação da maciez objetiva

Na Tabela 10, estão apresentados os resultados da força de cisalhamento dos salames tipo italiano, em função do tempo de armazenamento.

Tabela 10 - Médias (\pm desvios padrão) dos valores da maciez objetiva (Kgf) das amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento

Tratamento	Tempo (dias)		
	0	15	30
SCO	2,11 \pm 1,61 ^{aA}	2,38 \pm 2,02 ^{aA}	2,38 \pm 1,86 ^{aA}
SCS	1,94 \pm 0,82 ^{aA}	2,00 \pm 1,27 ^{aA}	2,54 \pm 1,54 ^{aA}
SCC	2,59 \pm 1,97 ^{aA}	2,38 \pm 1,81 ^{aA}	2,92 \pm 1,93 ^{bB}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Duncan.

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

Observa-se que nem os tratamentos aplicados ou os tempos de estocagem afetaram os valores de força de cisalhamento obtidos nos tratamentos SCO e SCS. Esses resultados sugerem a estabilidade do produto pronto que se mantém com uma maciez

constante durante toda a estocagem. Ao 30° dia de armazenamento, o tratamento SCC apresentou valor de força de cisalhamento superior ($p \leq 0,05$) aos demais tratamentos e aos tempos de estocagem de 0 e 15 dias.

Estes resultados também se relacionam com os valores já apresentados para a Aw (Tab. 6), que indicam que o tratamento SCC apresentou o menor ($p \leq 0,05$) valor em comparação aos demais tratamentos aos 30 dias de estocagem. Esse fato permite inferir que quanto menor a Aw do salame maior será a força de cisalhamento apresentada ao corte. Outro fator que pode interferir nessa avaliação é o percentual de lipídeos, que embora tenha um valor mais elevado no tratamento SCC aos 30 dias, não se observa diferenças estatísticas ($p > 0,05$) frente aos demais tratamentos.

Neste experimento, os percentuais de lipídeos (Tab. 12) variaram de 16,21 a 18,88, valores próximos aos relatados por Lorenzo *et al.* (2011), que ao avaliarem o efeito do teor de gordura (20, 30, e 40%) sobre as propriedades sensoriais de embutidos secos curados, concluíram que a força de cisalhamento diminuiu quando o teor de gordura se eleva, tendo observado valores de 3,81, 2,37 e 1,45 Kg, respectivamente, para os três níveis de gordura.

Resultados bastante próximos também foram observados por Slavica *et al.* (2011), que ao avaliarem a maciez utilizando lâmina de cisalhamento Warner-Bratzler em amostras de "Užička", um embutido fermentado e maturado tradicional da Sérvia, obtiveram valores entre 2,4 e 4,4 Kg.

Deve-se destacar que os valores de força de cisalhamento obtidos neste experimento são de difícil comparação com a literatura, pois existem poucos trabalhos que avaliaram a força de cisalhamento desse tipo de produto pelo mesmo método utilizado.

Triki *et al.* (2013) analisaram a textura de embutidos fermentados dessecados de 40 mm de diâmetro, que tiveram a gordura de porco substituída por óleos de azeite, linhaça e peixe. Foram avaliados, à temperatura de 22° C, cilindros (diâmetro = 20 mm, altura = 20 mm) que foram comprimidos até 50% da sua altura original, em que foi observado aumento gradativo dos valores da força de compressão, ao longo do período de estocagem, partindo de 3,93 Kg no dia 0 até 5,83 Kg, aos 61 dias de estocagem.

Em um estudo de Reis e Soares (1998), foi avaliada a força de cisalhamento de salames tipo colonial contendo carne suína e ovina utilizando lâmina de Warner-Bratzler. A partir de cilindros padronizados com 13 mm de diâmetro e 4 cm de comprimento, foi obtida uma força de cisalhamento de 3,56 Kg, identificados pela preferência dos consumidores como salames macios, e valores de 5,35 Kg como salames duros.

Salames menos gordurosos apresentam maior dureza, assim como a redução da umidade torna a matriz da carne mais compacta, contribuindo para o aumento da dureza do produto (GARCIA; GALEAZZI; SOBRAL, 2000; TRIKI *et al.*, 2013).

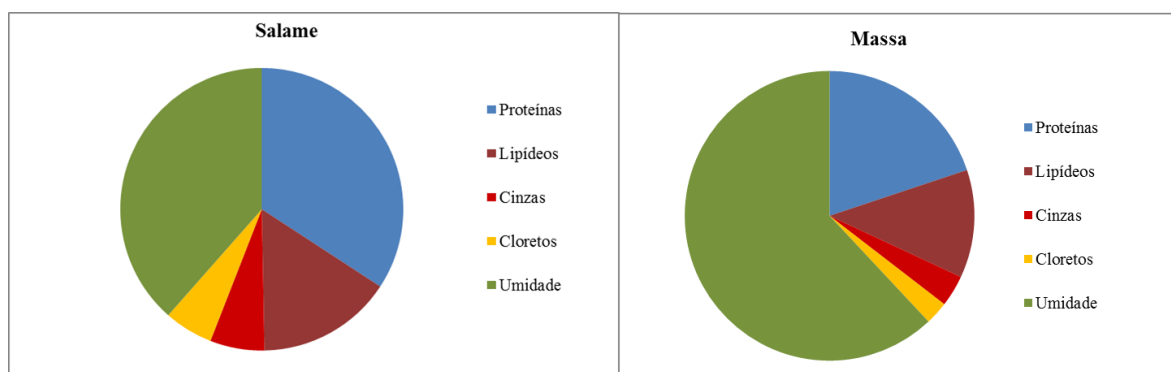
A literatura mostra resultados variáveis para força de cisalhamento de embutidos fermentados. Neste experimento não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) em função do armazenamento para os resultados de força de cisalhamento entre os blocos, exceto no 30° dia para o tratamento SCC em relação aos demais tratamentos e aos tempos de armazenamento. A heterogeneidade pode ocorrer, embora as formulações tenham idêntica composição, devido ao processamento e às características da massa do salame (distribuição da carne e da gordura), fatores esses que podem ter resultado em variações na maciez.

5.2.2.5 Composição centesimal

A carne e seus derivados, como na maioria dos alimentos, possuem um sistema de compensação entre os níveis de umidade, proteína e lipídeos (RECH, 2010). A composição centesimal da massa de salame teve médias de 21,22% \pm 1,11 de proteínas, 12,89% \pm 4,90 de lipídeos, 3,74% \pm 0,6 de cinzas, 2,76% \pm 0,18 de cloretos e 66,17% \pm 0,71 de umidade.

Na Figura 19, observam-se as diferenças da composição centesimal entre a massa e o salame pronto.

Figura 19 - Proporção de proteínas, lipídeos, cinzas, cloretos e umidade da massa e do salame



A umidade na massa dos salames estava maior que no produto pronto, porque o período de maturação resulta na desidratação do salame. Com isso, os lipídeos, as proteínas, as cinzas e cloretos se concentraram ao término da maturação.

Na Tabela 11, estão relacionados os resultados da composição centesimal dos tratamentos em função do tempo de armazenamento.

Tabela 11 - Média (\pm desvios padrões) da composição centesimal nas amostras de salame, segundo tratamento e tempo de armazenamento

	Tempo (dias)	Tratamentos		
		SCO	SCS	SCC
Proteína (%)	0	36,15 \pm 7,07	36,79 \pm 5,34	36,61 \pm 6,47
	30	35,39 \pm 5,50	36,17 \pm 4,87	36,62 \pm 5,24
Lipídeos (%)	0	16,37 \pm 4,44	17,85 \pm 1,37	16,74 \pm 2,35
	30	16,21 \pm 2,29	18,30 \pm 1,25	18,88 \pm 1,60
Cinzas (%)	0	6,58 \pm 1,18	6,70 \pm 0,85	6,65 \pm 1,26
	30	6,43 \pm 0,79	6,64 \pm 0,62	6,51 \pm 0,67
Cloretos (%)	0	5,89 \pm 1,01	5,89 \pm 0,62	5,74 \pm 0,85
	30	5,84 \pm 0,63	6,10 \pm 0,56	5,94 \pm 0,62
Umidade (%)	0	40,69 \pm 7,59	40,51 \pm 4,81	41,60 \pm 8,32
	30	42,81 \pm 6,96	40,93 \pm 5,44	40,43 \pm 6,19

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

A análise de composição centesimal dos salames foi efetuada no dia 0, ou seja, no dia em que os salames finalizaram o período de maturação, e depois de 30 dias de armazenamento.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$), após 30 dias de armazenamento, em relação aos componentes nos três tratamentos (SCO, SCS e SCC). Os tratamentos obtiveram resultados estatisticamente iguais para umidade, proteína, lipídeos, cinzas e cloretos, tanto no tempo 0 quanto no tempo de 30 dias de armazenamento.

A umidade ficou acima dos 35% indicado para salame tipo italiano, chegando a apresentar 42,81% no tratamento SCO, após 30 dias de estocagem. Apesar do ligeiro aumento da umidade após 30 dias para os tratamentos SCO e SCS, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), fato ao qual foram atribuídas as diferenças existentes entre as peças. Os resultados de umidade apresentaram-se acima dos valores encontrados por Rech (2010), que obteve valores entre 34,66 e 34,99% em salames tipo italiano adicionados de substitutos de NaCl.

Nobile *et al.* (2009) observaram baixa umidade nos embutidos fermentados adicionados de gordura de porco, obtendo o resultado de 26,01%, enquanto em embutidos fermentados nos quais a gordura foi substituída por pão branco embebido em azeite de oliva a umidade foi de 37,40%. Hoz *et al.* (2004) obtiveram valores ligeiramente mais altos em embutidos fermentados secos do que os resultados deste experimento para umidade, com valores entre 45 e 46,68%. Macedo *et al.* (2008) encontraram valores de umidade que variaram entre 38,54 a 41,48% para salame, corroborando com o presente estudo.

Os lipídeos apresentaram resultados relativamente baixos se comparado ao máximo de 35% estabelecido pela legislação, variando entre 16,21 e 18,88%. Rech (2010) obteve uma variação entre 30,01 e 31,73%, enquanto Nobile *et al.* (2009) relataram valores entre 23,64 e 29,84%. Mendonza *et al.* (2001) obtiveram 31,6% de lipídeos no embutido

fermentado seco tradicional, e 16,3% em embutido fermentado seco, com baixo conteúdo de gordura. Olivares *et al.* (2010) apresentaram variação entre 22 a 28% de lipídeos em embutidos fermentados secos, com 10 a 30% de gordura adicionada.

O conteúdo protéico manteve-se bem acima de 25%, atendendo a legislação. Os resultados variaram entre 35,39 e 36,79%, próximo aos resultados de 30,82 e 38,52%, observados por Nobile *et al.* (2009). Mendonza *et al.* (2001) obtiveram 24% de proteína em amostras de embutidos fermentados secos, com alto teor de lipídeos, e 36,2% em amostras de embutidos fermentados secos com baixo teor de lipídeos. Olivares *et al.* (2010) também encontraram valores semelhantes entre 33,17 e 35,86%, sendo que o maior valor foi do tratamento com médio teor de gordura. Resultados inferiores foram relatados por Rech (2010), os quais apresentaram em média 25% de proteína em salames tipo italiano.

Em relação às cinzas e cloretos não há um padrão definido na legislação brasileira. Os tratamentos apresentaram em média 6,58% de cinzas e 5,90% de cloretos. Nobile *et al.* (2009) apresentaram valores similares em alguns tratamentos de embutido fermentado, com uma média de 6,78%. Rech (2010) obteve uma variação entre 5,48 e 5,93, enquanto Mendonza *et al.* (2001) encontraram uma variação de 5,1 a 7,1% de cinzas, sendo que valores maiores foram relatados em amostras de embutido fermentado, com baixo teor de lipídeos. A quantidade de cinzas no produto pode estar relacionada às variações de umidade e quantidade de sal adicionado (SANTA, 2008).

O sal é responsável por diversos efeitos tecnológicos na produção de salames, no entanto, deve-se reduzir o consumo de sal por causa dos riscos provocados à saúde, incluindo pressão alta (hipertensão) que agrava doenças cardiovasculares, renais e o diabetes. Vários estudos sobre substitutos do sal têm sido desenvolvidos, nos quais foram testados o KCl, MgCl₂, CaCl₂. A mistura desses sais tem se mostrado eficiente e reduz 50% a quantidade de sódio (TODRÁ; REIG, 2011). Além dos substitutos do NaCl há ainda outras duas opções: incluir aromatizantes nos produtos cárneos que imitem o sabor do sal e alterar a estrutura física do NaCl, a fim de prevenir o uso excessivo do sal (WEISS *et al.*, 2010).

Por fim, os resultados da composição centesimal dos tratamentos ficaram dentro das características de salame tipo italiano fixadas pela legislação brasileira, exceto para a quantidade de umidade (BRASIL, 2000, 2003).

5.2.3 Avaliação microbiológica

Na Tabela 12, encontram-se os resultados das análises de coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. para cada tratamento.

Tabela 12 - Análises microbiológicas realizadas nas amostras de salame

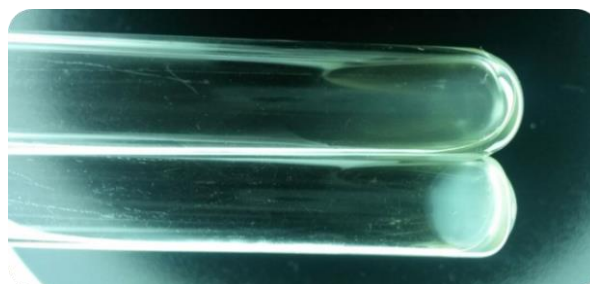
Tratamentos	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes a 45°C (NMP/g)	<i>Staphylococcus</i> Coagulase positiva (UFC/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp (em 25g)
SCO	$<7,3 \times 10$	<1	$1,14 \times 10^3$	$8,17 \times 10^4$	ausente
SCS	$<2,77 \times 10^2$	<1	$1,72 \times 10^3$	$14,21 \times 10^4$	ausente
SCC	$<5 \times 10$	<1	$1,91 \times 10^3$	$13,31 \times 10^4$	ausente

SCO: controle; SCS: cultura selecionada; SCC: cultura comercial.

Os resultados de coliformes totais foram baixos e não foi detectada a presença de coliformes termotolerantes, indicando a qualidade das condições higiênico-sanitárias da matéria-prima, ambiente e manipuladores.

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva estimada foi abaixo do limite exigido pela legislação (5×10^3). A presença desse micro-organismo é avaliada através da formação de coágulo em plasma de coelho, durante a prova de coagulase (Figura 20).

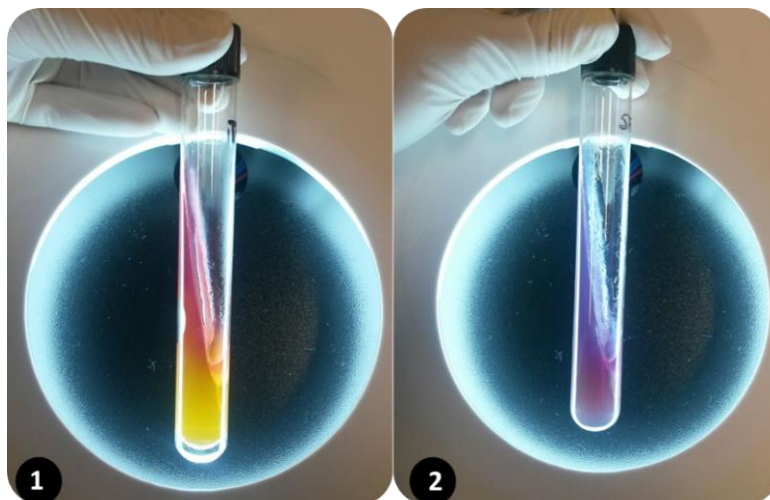
Figura 20 - Prova de coagulase feita com plasma de coelho



Era esperada a detecção de *Staphylococcus* coagulase negativa nos salames devido à sua presença na cultura iniciadora comercial, por fazer parte naturalmente da microbiota da carne e por estar presente no ambiente de fabricação dos salames, visto que *S. xylosus* é utilizado como cultura iniciadora para a produção dos embutidos cárneos fermentados comercializados pela salumeria.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em 25g de salame amostrados dos 3 tratamentos, estando, portanto, de acordo com a legislação. Na Figura 21, estão representadas amostras suspeitas de presença de *Salmonella* spp.

Figura 21 - Amostras com suspeita de presença de *Salmonella* spp.



(1) Tubo com meio TSI e (2) Tubo com meio LIA.

As amostras que apresentaram alguma suspeita nos tubos contendo os meios TSI e LIA, foram testadas em meio Rugai modificado. Esse meio permite os testes de motilidade, lisina descarboxilase, urease, descarboxilação da lisina, fermentação da glicose e da sacarose, produção de gás a partir da glicose, desaminação do L-Triptofano e formação de indol.

Na Figura 22, estão representados os resultados da análise de *Salmonella* spp. em meio Rugai modificado.

Figura 22 - Análise de *Salmonella* spp. em meio Rugai modificado.



(1) tubo controle sem inoculação; (2) resultado final da inoculação com a amostra suspeita de *Salmonella* spp. e (3) Identificação de *Salmonella* spp. e *Salmonella typhi* (MBIOLOG, 2015).

Neste último teste para *Salmonella* spp., o resultado foi negativo para todas as amostras.

Os resultados das análises microbiológicas apontam que o processamento dos salames tipo italiano foi feito com qualidade sanitária. Este fato nem sempre encontrado em pequenas fábricas no Brasil, onde, frequentemente, as características microbiológicas dos produtos são reprovadas (SANTA, 2008).

Em um estudo anterior, as linhagens de *Lactobacillus satsumensis* 23P3 e *Leuconostoc mesenteroides* 13U2 apresentaram boa capacidade e atividade inibitória frente às linhagens de *Listeria monocytogenes in vitro*. As linhagens de BAL isoladas de kefir são produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes* que, possivelmente, a partir de concentrados dessas substâncias pode-se atingir maior potencial inibitório com possibilidade de uso em alimentos para garantir inocuidade (AUAD, 2014).

As amostras de salame tipo italiano dos tratamentos SCO, SCS e SCC atenderam aos padrões microbiológicos regulamentados através da Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

6. CONCLUSÃO

- As linhagens de BAL selecionadas (*Lactobacillus satsumensis* e *Leuconostoc mesenteroides*) demonstraram boa capacidade de acidificação e rápido crescimento;
- A adição da cultura iniciadora selecionada (SCS) reduziu o tempo de fermentação quando comparado ao tratamento controle (SCO), atingindo valores de pH ideal ($\leq 5,3$);
- Durante toda a estocagem, o tratamento adicionado de cultura iniciadora comercial (SCC) mostrou-se estável; entretanto, os tratamentos SCS e SCO apresentaram odor de ranço aos 60 dias e foram descartados;
- A cultura iniciadora selecionada se mostrou promissora na fabricação de embutidos cárneos fermentados, como o salame tipo italiano;
- O uso das culturas iniciadoras *Lactobacillus satsumensis* e *Leuconostoc mesenteroides*, se produtoras de compostos antimicrobianos, poderá contribuir para a inocuidade de embutidos cárneos fermentados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Relatório Anual de 2012/2013.** Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2012_pt.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2015.

ABIPECS. Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Relatório Anual de 2009/2010.** Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/relatorios-associados/ABIPECS_relatorio_2009_pt.pdf>. Acesso em: 05 jan. 2015.

ALEGRÍA, A.; DELGADO, S.; ROCES, C.; LÓPEZ, B.; MAYO, B. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 61-66, 2010.

ALTAY, F.; KARBANCIUGLU-GÜLER, F.; DASKAYA-DIKMEN, C.; HEPERKANET, D. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 44-56, 2013.

AMBROSIADIS, J.; SOULTOS, N.; ABRAHIM, A.; BLOUKAS, J. G. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. **Meat Science**, v. 66, p. 279-287, 2004.

AMI. American Meat Institute. Analysis of microbiological hazards associated with dry and semi-dry sausage products. In.: **Good Manufacturing Practices for Fermented Dry & Semi-Dry Sausage Products**. 1997. 25p.

AMMOR, M. S.; 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.

ARO-ARO, J. M.; NYAM-OSOR, P.; TSUJI, K.; SHIMADA, K. I.; FUKUSHIMA, M.; SEKIKAWA, M. The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages. **Food Chemistry**, v. 119, p. 279-285, 2010.

AUAD, L. I. **Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *listeria monocytogenes*.** 2014. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BERNÁLDEZ, A.; CÓRDOBA, J. J.; RODRÍGUEZ, M.; CORDERO, M.; POLO, L.; RODRÍGUEZ, A. Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón”. **Food Control**, v. 32, p. 69 - 76, 2013.

BESHKOVA, D.; FRENGOVA, G. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 419-432, 2012.

BONOMO, M. G.; RICCIARDI, A.; ZOTTE, T.; SICO, M. A.; SALZANO, G. Technological and safety characterization of coagulase-negative *Staphylococci* from traditionally fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). **Meat Science**, v. 83, p. 15-23, 2009.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431 – 1438, 2008.

BOZKURT, H.; ERKMEN, O. Effects of starter culture and additives on the quality of Turkish style sausage (sucuk). **Meat Science**, v. 61, p. 149-156, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de julho de 1999. Oficializa os métodos analíticos físico-químicos, para controle de produtos cárneos e seus ingredientes – sal e salmoura, em conformidade ao anexo desta instrução normativa, determinando que sejam utilizados no sistema de laboratório animal do departamento de defesa animal. **Diário Oficial**, Brasília, Seção 1, p. 10, 27 jul. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 22 de 31 de junho de 2000**, Anexo V. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame. Diário Oficial da União, Brasília, 3 ago. 2000. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em: 27.out.2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01.rdc.htm>>. Acesso em: 27 out. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada. **RDC nº. 02, de 07 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, 09 jan. 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdac5c80474597399f7ddf3fbc4c6735/rdc_02.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 04 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do abastecimento. **Instrução Normativa nº 55, de 07 de julho de 2003**. Altera o subitem nº 4.2.2, dos anexos V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII, da Instrução Normativa nº 22, de 31 de junho de 2000, referente aos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Salames. Diário Oficial da União, Brasília, 08 de julho de 2003, p. 28. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 27 out. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 46, de 23 de outubro de 2007**. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília, 24 out. 2007, seção 1, p. 5. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 04 out. 2014.

BROMBERG, B.; MORENO, I.; ZAGANINI, C. L.; DELBONI, R. R.; OLIVEIRA, J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 137-144, 2004.

BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 253-272, 1993.

BURTON, J. P.; CHILCOTT, C. N.; MOORE, C. J.; SPEISER, G.; TAGG, J. R. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, p. 754-764, 2006.

BURTON, J. P.; DRUMMOND, B. K.; CHILCOTT, C. N.; TAGG, J. R.; THOMSON, W. M.; HALE, J. D. F.; WESCOMBE, P. A. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 875-884, 2013.

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

CARASI, P.; JACQUOT, C.; ROMANIN, D.; ELIE, A. M.; DE ANTONI, G. L.; URDACI, M. C.; SERRADELL, M. A. Safety and potential beneficial properties of *Enterococcus* strains isolated from kefir. **International Dairy Journal**, v. 39, p. 193-200, 2014.

CARNEIRO, R. P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. 2010. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CARVALHO, N.C. **Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na infecção experimental com *Salmonella typhimurium* em camundongos.** 2011. 135f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; VILLANI, F. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. **Meat Science**, v. 71, p. 643-650, 2005.

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

CASABURI, A.; DI MONACO, S.; CAVELLA, S.; TOLDRÁ, F.; ERCOLINI, D.; VILLANI, F. Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. **Food Microbiology**, v. 25, p. 335-347, 2008.

CASTRO, M. P.; PALAVECINO, N. Z.; HERMAN, C.; GARRO, O. A.; CAMPOS, C. A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science**, v. 87, p. 321-329, 2011.

CAVENAGHI, A. D., OLIVEIRA, M. N. Influência de algumas características físico-químicas e sensoriais na qualidade de salame tipo italiano fabricado no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, v. 23, n. 263, p. 44-48, 1999 *apud* GARCIA, F. T.; GAGLEAZZI, U. A.; SOBRAL, P. J. A. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, n. 48, p. 151-158, 2000.

CIROLINI, A. ***Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis* ssp *lactis* nativos utilizados na elaboração de salame tipo italiano.** 2008.96f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D.; SANTOS, B. A.; CERVO, G. D.; REZER, A. P. S. Salame tipo italiano elaborado com culturas *starters* nativas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 171-179, 2010.

CHOI, H. J.; LEE, H. S.; HER, S.; OH, D. H.; YOON, S. S. Partial the characterisation and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable Kimchi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p.175-181,1999.

CORBO, M. R.; BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Selection of promising lactic acid bacteria as starter cultures for sourdough: using a step-by-step approach through quantitative analyses and statistics. **Journal of the Science Food Agriculture**, v. 94, p. 1772-1780, 2014.

CORRÊA, N. B.; PÉRET FILHO, L. A.; PENNA, F. J.; LIMA, F. M.; NICOLI, J. R. A randomized formula controlled trial of *Bifidobacterium lactis* and *Streptococcus thermophilus* for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 39, p. 385-389, 2005.

DEVRIESE, L.; BAELE, M.; BUTAYE, P. The genus *Enterococcus*: Taxonomy. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria**. 3rd ed. New York: Springer, v. 4, 2006. p. 163-174.

DIAS, F. S.; AVILA, C. L. S.; SCHWAN, R. F. *In situ* Inhibition of *Escherichia coli* isolated from fresh pork Sausage by organic acids. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, 2011.

DIMIĆ, G. R. Characteristics of the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from fresh vegetables. **APTEFF**, v. 37, p. 3-11, 2006.

DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. *InfoStat, versión 2008*, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2008.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; NASIS, P.; GALIOTOU, M.; METAXOPOULOS, J. Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1314-1323, 2005.

DUCIC, M.; BLAGOJEVIC, B.; MARKOV, S.; VELICANSKI, A.; BUNCIC, S. General patterns of background microbiota and selected bacterial pathogens during production of fermented sausages in Serbia. **Food Control**, v. 43, p. 231-237, 2014.

EL-GHAISH, S.; AHMADOVA, A.; HADJI-SFAXI, I.; MECHERFI, K. E.; BAZUKYAN, I.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; SITOHY, M.; POPOV, Y. G.; KULIEV, A. A.; MOZZI, F.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. **Food Science & Technology**, v. 22, p. 509-516, 2011.

ENDO, A.; OKADA, S. *Lactobacillus satsumensis* sp. nov., isolated from mashes of shochu, a traditional Japanese distilled spirit made from fermented rice and other starchy materials. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 83–85, 2005.

ERKKILÄ, S.; SUIHKO, M. L.; EEROLA, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOM, T. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 205-210, 2001.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus *Lactobacillus*** (2015). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html>>. Acesso em: 02 jan. 2015^a.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus *Pediococcus*** (2015). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/pediococcus.html>>. Acesso em: 03 jan. 2015^b.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus *Enterococcus*** (2015). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso em: 03 jan. 2015^c.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus *Streptococcus*** (2015). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>>. Acesso em: 03 jan. 2015^d.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus *Leuconostoc*** (2015). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/leuconostoc.html>>. Acesso em: 02 jan. 2015^e.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus *Lactococcus*** (2015). Disponível em: <<http://www.bacterio.net/lactococcus.html>>. Acesso em: 02 jan. 2015^f.

FADDA, S.; LÓPEZ, C.; VIGNOLO, G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. **Meat Science**, v. 86, p. 66–79, 2010.

FAO/WHO. Food And Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Rome: FAO: World Health Organization, 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>. Acesso em: 03 out. 2014.

FARNWORTH, E.R. Kefir - a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin**, v. 2, p. 1-17, 2005.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir –A Fermented Milk Product. In: Farnworth, E. R. **Handbook of Fermented Functional Foods**. 2nd ed. Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. p. 89-127.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, J. A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; HOZ, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 201-209, 2000.

FERNANDEZ, B.; LAY, C. L.; JEAN, J.; FLISS, I. Growth, acid production and bacteriocin production by probiotic candidates under simulated colonic conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 877-885, 2013.

FIorentini, A. M.; SAWITZKI, M. C.; BERTOL, T. M.; BROD, F. C. A.; PELISSER, M. R.; ARISI, M. C.; SANT'ANNA, E. S. M. Phenotypic and Molecular Characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological Potential for Use in Fermented Sausage. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52 n.3, p. 737-746, 2009.

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 35-50, 2013.

FONT-I-FURNOLS, M.; GUERRERO, L. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. **Meat Science**, v. 98, p. 361-371, 2014.

FRANZ, C. M. A. P.; VANCANNEYT, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; WACHTER, M.; CLEENWERCK, I.; HOSTE, B.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H.; SWINGS, J. *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 329-333, 2006.

FRANZ, C. M. A. P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 125-140, 2011.

GAO, Y.; LI, D.; LIU, X. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. **Food Control**, v. 35, p. 1-6, 2014.

GARCIA, F. T.; GAGLEAZZI, U. A.; SOBRAL, P. J. A. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, n. 48, p. 151-158, 2000.

GARDINI, F.; MARTUSCELLI, CRUDELE, M. A.; PAPARELLA, A.; SUZZI, G. Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. **Meat Science**, v. 61, 275-283, 2002.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Microbial interactions in kefir: A natural probiotic drink. In: MOZZI, F.; RAYA, R.R.; VIGNOLO, G.M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. p. 327-336.

GIRMA, G.; KETEMA, T.; BACHA, K. Microbial load and safety of paper currencies from some food vendors in Jimma Town, Southwest Ethiopia. **BMC Research Notes**, v. 7, p. 843, 2014.

GLÓRIA, M. B. A. 2005. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L. L. **Handbook of food science**. New York: Marcel Dekker, 2005. p. 38.

GRAZIA, L.; ROMANO, P.; BAGNI, A.; ROGGIANI, D.; GUGLIELMI, G. The role of moulds in the ripening process of salami. **Food Microbiology**, v. 3, p. 19-25, 1986.

GRECO, M.; MAZZETTE, R.; De SANTIS, E. P. L.; CORONA, A.; COSSEDDU, A. M. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. **Meat Science**, v. 69, p. 33-739, 2005.

GULITZA, A.; STADIEA, J.; WENNINGB, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 284-288, 2011.

HAMES, W. P.; HALLER, D.; GÄNZLE, M. G. Fermented Meat. In: FARNWORTH, E. R. **Handbook of Fermented Functional Foods**. 2nd ed. Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. p. 291-351.

HAMES, W. P. Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. **Food Microbiology**, v. 29, p. 151-156, 2012.

HARTMANN, H. A.; WILKE, T.; ERDMANN, R. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 192–199, 2011.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, O.; MUTHAIYAN, A.; MORENO, F. J.; MONTILLA, A.; SANZ, M. L.; RICKE, S. C. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. **Food Microbiology**, v.30, p.355-361, 2012.

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. 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.

HOLCK, A. L.; AXELSSON, L.; RODE, T. M.; HØY, M.; MÅGE, I.; ALVSEIKE, O.; L'ABÉE-LUND, T. M.; OMER, M. K.; GRANUM, P. E.; HEIR, E. Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. **Meat Science**, v.89, p.286–295, 2011.

HOLZAPFEL, W. H. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 197-212, 2002.

HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C.M.A.P.; LUDWIG, W.; BACK, W.; DICKS, L.M.T. The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKENBRANDT, E. **The Prokaryotes**. eds. New York: Springer, 2006. p. 229-266.

HOZ, L. ; D'ÁRRIGO, M.; CAMBERO, I.; ORDÓÑEZ, J. A. Development of an *n*-3 fatty acid and α -tocopherol enriched dry fermented sausage. **Meat Science**, v. 67, n. 3, p. 485-495, 2004.

ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKENBRANDT, E. **The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria**. 3rd ed. New York: Springer, v. 4, 2006. p. 229-266.

HOSPITAL, X. F.; HIERRO, E.; FERNÁNDEZ, M. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella Typhimurium*. **Food Research International**, v. 62, p. 410-415, 2014.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T.; MONFORT, J. M. Biochemical characterization of Lactobacilli from dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 107-113, 1993.

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

HUTKINS, R.W. Micororganisms and Melabolism. In: _____. **Microbiology and technology of fermented foods**. 1st ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. p. 15-66^a.

HUTKINS, R.W. Starter Cultures. In: _____. **Microbiology and technology of fermented foods**. 1st ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. p. 67-106^b.

HUTKINS, R.W. Meat Fermentation. In: _____. **Microbiology and technology of fermented foods**. 1st ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. p. 207-232^c.

JAY, J. M. Fermentação e produtos lácteos fermentados. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.131-147.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 216-222, 2012.

JESSEN, B. Starter cultures for meat fermentation. In: CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E. **Fermented Meats**. eds. Blackie Academic & Professional Glasgow, 1995. p. 130-159.

KABAN, G.; KAYA, M. Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. **Food Control**, v. 17, p. 797-801, 2006.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTOPOULOU, K.; SKARMOUTSOU, N.; FAKIRI, E. M. Health benefits of probiotics: Review. **International Scholarly Research Notices Nutrition**, v. 2013, p.1-7, 2013.

KESMEN, Z.; KACMAZ, N. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. 276-283, 2011.

KIM, I. S.; JO, C.; LEE, K. H.; AHN, D. U.; KANG, S. N. Effects of low-level gamma irradiation on the characteristics of fermented pork sausage during storage. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 81, p. 466-472, 2012.

LARA-FLORES, M.; OLVERA-NOVOA, M. A.; GUZMÁN-MÉNDEZ, B. E.; LÓPEZ-MADRID, W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 216, p.193-201, 2003.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564-2572, 2014.

LEISTNER, L.; ROEDEL, W. The significance of water activity for microorganisms in meats. In: Duckworth, R. B. Water relations of foods. London: Academic Press,1975. p. 309-323 *apud* AMBROSIADIS, J.; SOULTOS, N.; ABRAHIM, A.; BLOUKAS, J. G. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. **Meat Science**, Oxford, v. 66, p. 279-287, 2004.

LEITE, A. M. O.; LEITE, D. C. A.; DEL AGUILA, E. M.; ALVARES, T. S.; PEIXOTO, R. S.; MIGUEL, M. A.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.7, p.4149-4159, 2013.

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

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

LIVINGSTON, D. J.; BROWN, W. D. The chemistry of myoglobin and its reactions (Meat pigments, food quality indices). **Food Technology**, v. 35, n. 5, p. 238-252, 1981.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIJAR, J. Kefir: a symbiotic yeasts bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 67-74, 2006.

LORENZO, J. M.; TEMPERÁN, S.; BERMÚDEZ, R.; PURRIÑOS, L.; FRANCO, D. Effect of fat level on physicochemical and sensory properties of dry-cured duck sausages. **Poultry Science**, v.90, p.1334-1339, 2011.

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

KABAN, G.; KAYA, M. Effect of starter culture on growth of *Staphylococcus aureus* in sucuk. **Food Control**, v. 17, p. 797 - 801, 2006.

MAGALHÃES, K.T; PEREIRA, G.V.M; DIAS, D. R.; SCHWAN, R.F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1241-1250, 2010.

MAGALHÃES, K.T; PEREIRA, G.V.M; CAMPOS, C.R; DRAGONE, G.; SCHWAN, R.F. Brazilian kefir: microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011.

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER Jr., S. B.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S. Desenvolvimento de embutido fermentados por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p.509-519, 2008.

MARSH, A. J.; O’SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **Federation of European Microbiology Society Letter**, v. 348, p. 79-85, 2013.

MAURIELLO, G.; CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v. 67, n.1, p.149-158, May 2004.

MBIOLOG DIAGNOSTICOS. **Identificação presuntiva de bacilos gram-negativos a partir do desenvolvimento em Cled e Macconkey (URIPROV), no meio de Rugai com lisina**. Disponível em: <http://www.mbiolog.com.br/?page_id=252>. Acesso em: 19 jan. 2015.

MENDONZA, E.; GARCÍA, M. L.; CASAS, C.; SELGAS, M. D. Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 57, p. 387-393, 2001.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; TODOROV, S. D.; SILVA JR, A.; FRANCO, B. D. G. M.; NERO, L. A. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 318-328, 2012.

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

NOBILE, M. A. D.; 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.

NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 396-405, 2006.

OGIER, J. C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 291-301, 2008.

OH, C. K.; OH, M. C.; KIM, S. H. The Depletion of sodium nitrite by lactic acid bacteria isolated from Kimchi. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, n. 1, p. 38–44, 2004.

OLIVARES, A.; NAVARRO, J. L.; SALVADOR, A.; FLORES, M. Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. **Meat Science**, v. 86, p. 251-257, 2010.

ORDOÑEZ, J. A. *et al.* **Tecnologia de alimentos** –Alimentos de origem animal. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005. 280p.

PATRICK, O.M. Lactic acid bacteria in health and disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**, v.1, n.1, p. 39-50, 2012.

PFANNEBECKER, J. **Entwicklung und Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Art- und Stamm-Identifizierung pro- und eukaryotischer Organismen**. 2008. 229f. Dissertação (Doutorado em Ciências Naturais) - Instituto de Pesquisa em Microbiologia e Vinho, Universidade Johannes Gutenberg de Mainz, Mainz, 2008.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RATTRAY, F. P.; O'CONNELL, M. J. Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 2011. p. 518-524.

REA, M. C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F. D.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, T. M. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 83-94, 1996.

RECH, R. A. **Produção de salame tipo italiano com teor de sódio reduzido**. 2010.70f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

REIS, A. G. B.; SOARES, G. J. D. Salame colonial processado com carne suína e ovina. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 2 n. 2, p. 115-120, 1998.

ROBINSON, K. R.; TAMIME, A. Y.; WSZOLEK, M. Microbiology of fermented milks. In: WOOD, B. J. B. **Dairy Microbiology Handbook**. 3rd ed. New York: Wiley-Interscience, 2002. p. 367-421.

RODE, T. M.; HOLCK, A.; AXELSSON, L.; HØY, M.; HEIR, E. Shiga toxigenic *Escherichia coli* show strain dependent reductions under dry-fermented sausage production and post-processing conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p. 227-233, 2012.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 404-408, 2005.

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

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.

RUIZ, J. N. **Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livre e microencapsulada em salame tipo Italiano**. 2011. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RUST, R. E. Productos Embutidos. In: PRICE, J.F.; SCHWEIGERT, B.S. **Ciencia de la carne y de productos carnicos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 415-440.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p.1-16, 2013.

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.

SANTA, O. R. D. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de salame tipo italiano**. 2008. 147f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, 2008.

SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage - A review. **British Food Journal**, v. 109, p. 280-290, 2007.

SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M.; BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 340-345, 2009.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, T.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 28, p. 1-6, 2002.

SLAVICA, V. M.; DRAGICA, K.; DEJANA, T.; DJORDJE, O.; NATALIJA, D.; MARIJA, J. Colour and texture characteristics of “Užička” fermented sausage produced in the traditional way. **Tehnologija mesa**. n. 54, v. 2, p. 137-143, 2013.

SMS. STABLE MICRO SYSTEMS. **User Guide**. Texture expert for Windows. Version 1.0 England: Copyright Stable mycro systems Ltda, 1997. 155p.

STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.

TAMIME, A. Y. Production of Kefir, Koumiss and other related products. In: TAMIME, AY. **Fermented Milk**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2006. p. 174-216, 2006.

TABANELLI, G.; MONTANARI, C.; GRAZIA, L.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Effects of aw at packaging time and atmosphere composition on aroma profile, biogenic amine content and microbiological features of dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 94, p. 177-186, 2013.

TALON, R.; LEROY, S. Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. **Meat Science**, v. 89, p. 303-309, 2011.

TRIKKI, M.; HERRERO, A. M.; SALAS, L. R.; COLMENERO, F. J.; CAPILLAS, C. R. Chilled storage characteristics of low-fat, n-3 PUFA-enriched dry fermented sausage reformulated with a healthy oil combination stabilized in a konjac matrix. **Food Control**, v. 1, p. 158-165, 2013.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - Production, genetic organization and mode of action. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 209-221, 2009.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 117-126, 2009.

TOLDRÁ, F.; REIG, M. Innovations for healthier processed meats. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 517-522, 2011.

VANCANNEYT, M.; ENGELBEEN, K.; WACHTER, M.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J. Reclassification of *Lactobacillus ferintoshensis* as a later heterotypic synonym of *Lactobacillus parabuchneri*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 2195-2198, 2005.

VARDJAN, T.; LORBEG, P. M.; ROGELJ, I.; MAJHENIČ, A. C. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2729-2736, 2013.

VASILEJIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikof to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 37-44, 2001.

VINDEROLA, C. G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGO, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, v.72, p. 195-202, 2005.

WEISS, J.; GIBIS, M.; SCHUH, V.; SALMINEN, H. Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. **Meat Science**, v. 86, p. 196-213, 2010.

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 473-480, 2011.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 1, p. 33-37, 2004.

WÓJCIAK, K. M.; DOLATOWISKI, Z. J.; KOŁOZYN-KRAJEWSKA, D.; SKOWSKA, M. T. The effect of the *Lactobacillus casei* lock 0900 probiotic strain on the quality of dry-fermented sausage during chilling storage. **Journal of Food Quality**, v. 35, p. 353–365, 2012.

ZANIRATI, D. F. **Caracterização de bactérias lácticas da microbiota de grãos de kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo por metodologias dependentes e independentes de cultivo**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

ZHU, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, p. 597-610, 2009.