



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

NATÁLIA MARTINS DOS SANTOS DO VALE

**AVALIAÇÃO MATEMÁTICA DA INOCULAÇÃO DOS
Lactobacillus casei e *Lactobacillus paracasei* SOBRE A
QUALIDADE NUTRICIONAL, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-
QUÍMICAS E TEMPO DE VIDA ÚTIL DE EMBUTIDO
FERMENTADO “TIPO SALAME” DE OVINO**

Recife/PE

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

NATÁLIA MARTINS DOS SANTOS DO VALE

Avaliação matemática da inoculação dos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* sobre a qualidade nutricional, características físico-químicas e tempo de vida útil de um embutido fermentado tipo salame de ovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR/A: Prof^aDr^a Michelle Rayssa Pereira de Melo

CO-ORIENTADORA: Prof^aDr^a Jenyffer Medeiros Campos Guerra

Recife

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco Sistema
Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V149a do Vale, Natália Martins dos Santos
Avaliação matemática da inoculação dos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* sobre a qualidade nutricional, características físico-químicas e tempo de vida útil de um embutido fermentado tipo salame de ovino / Natália Martins dos Santos do Vale. - 2022.
140 f. : il.
- Orientador: Michelle Rayssa Pereira de Melo.
Coorientador: Jenyffer Medeiros Campos Guerra.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, 2022.
1. produto cárneo. 2. bactérias ácido-lácticas. 3. modelagem preditiva.. I. Melo, Michelle Rayssa Pereira de, orient. II. Guerra, Jenyffer Medeiros Campos, coorient. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Avaliação matemática da inoculação dos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* sobre a qualidade nutricional, características físico-químicas e tempo de vida útil de um embutido fermentado tipo salame de ovino

Por Natália Martins dos Santos do Vale

Esta dissertação será julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em __/__/__ pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Presidente Profa. Dra. Erilane de Castro Lima Machado
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Rodrigo Barbosa Acioli de Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Raimundo Bernadino Filho
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, por me guiar em todos os momentos, por seu amor incondicional, eterno e imutável, por todas as graças derramadas sobre mim, por me mostrar a luz em cada passo onde eu sozinha não conseguia, e por ser minha força quando encontrei as dificuldades encontradas nos caminhos percorridos até aqui.

À minha mãe, Ivanete Martins, e ao meu pai, Romulo Magalhães, por todo o apoio, companheirismo em todos os momentos, por nunca permitirem que eu desistisse de mais esse sonho, por toda a ajuda e por sempre estarem ao meu lado em cada momento, pela inspiração de pessoas éticas e corretas, por me ensinarem o caminho de luta e do bem; e principalmente pelo amor incansável. Minha gratidão, admiração e amor eterno.

Às minhas professoras, Michelle Melo por me aceitar e me acolher como sua orientada, Jenyffer Guerra por me co-orientar no presente trabalho, sou grata por estarem sempre dispostas a me ajudar e apoiar; e pela generosidade em compartilhar seus conhecimentos. Obrigada por me motivarem e me apoiarem, me sinto feliz por tê-las tido como mentoras nesta caminhada.

Aos meus colegas de Mestrado pela força e ajuda em cada disciplina cursada nesse período atípico que foi essa pandemia, por estarmos sempre unidos e com muita empatia e compreensão em cada passo que demos para alcançarmos hoje esse sonho. Sozinhos não fazemos nada.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de cursar esta pós-graduação que deu uma nova motivação e novo rumo à minha vida.

E por fim, agradeço muito a todos que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional durante esta pós-graduação e tornaram possível e mais fácil minha chegada até aqui.

“Existem duas formas de viver a vida: uma é como se nada fosse um milagre, a outra é como se tudo fosse um milagre. Eu acredito na última.”

Albert Einstein.

RESUMO

Mudanças no estilo de vida da população contribuem na busca de consumo e produção de alimentos mais saudáveis. Neste meio podem-se destacar os produtos cárneos, como os de origem ovina adicionados de cultura probiótica, pois apresentam compostos benéficos à saúde, sendo considerados funcionais. O objetivo do trabalho foi produzir dois embutidos fermentados tipo salame de carne ovina, um inoculado com o probiótico *Lactobacillus casei* e outro inoculado com o probiótico *Lactobacillus paracasei*, acompanhar, padronizar e garantir a qualidade dos mesmos, bem como avaliar matematicamente o crescimento dos microrganismos comparando o de melhor eficiência para ação bioconservante e probiótica. Foram realizadas análises físico-químicas de pH, acidez titulável, umidade, cinzas, lipídeos e proteínas, análises de textura e cor. Os ensaios microbiológicos e a contagem das bactérias ácido-lácticas (BAL). A modelagem matemática foi feita pelo software MicroFit para obter os ajustes pelas equações dos modelos Baranyi e Roberts (BAR) e Gompertz (GOM). Os resultados microbiológicos obtidos estavam dentro dos padrões vigentes pela legislação às Boas Práticas de Fabricação (BPF), armazenamento adequado, bem como a presença de probióticos, contribuíram para esses resultados. A contagem de BAL foi realizada em 84 dias, no qual os embutidos fermentados apresentaram ao fim deste prazo valores acima de 10^7 UFC/mL, suficiente para apresentar atividade probiótica segundo a legislação. A aplicação dos modelos matemáticos propostos mostrou-se eficiente apenas para o modelo Baranyi e Roberts durante a vida útil dos embutidos fermentados, apresentando as curvas das BAL totalmente ajustável e aplicável para o modelo BAR. Diante da adequação do modelo, pode-se garantir que os produtos mantiveram viabilidade das cepas probiótica por 84 dias, ações bioconservantes sem a presença de contaminantes patógenos, bem como apresentou qualidade microbiológica assegurada e condições de consumo adequadas uma vez que estão dentro dos padrões definidos pela legislação.

Palavras-chave: produto cárneo, bactérias ácido-lácticas, modelagem preditiva.

ABSTRAT

Changes in the population's lifestyle contribute to the search for consumption and production of healthier foods. In this medium, meat products, such as those of sheep origin, added with probiotic culture, can be highlighted, as they present beneficial compounds to health, being considered functional. The objective of this work was to produce two fermented sausages, one inoculated with the probiotic *Lactobacillus casei* and the other inoculated with the probiotic *Lactobacillus paracasei*, monitor, standardize and guarantee their quality, as well as mathematically evaluate the growth of microorganisms comparing the one with the best efficiency for biopreservative and probiotic action. Physicochemical analyzes of pH, titratable acidity, moisture, ash, lipids and proteins, texture and color analyzes were performed. Microbiological assays and lactic acid bacteria (LAB) counting. Mathematical modeling was performed using MicroFit software to obtain the adjustments by the equations of the Baranyi and Roberts (BAR) and Gompertz (GOM) models. The microbiological results obtained were within the standards in force by the legislation on Good Manufacturing Practices (GMP), adequate storage, as well as the presence of probiotics, contributed to these results. The BAL count was performed in 84 days, in which the fermented sausages presented values above 10^7 CFU/mL at the end of this period, sufficient to contain probiotic activity according to the legislation. The application of the proposed mathematical models proved to be efficient only for the Baranyi and Roberts model during the shelf life of the fermented sausages, presenting the BAL curves fully adjustable and applicable to the BAR model. In view of the adequacy of the model, it can be guaranteed that the products maintained the viability of the probiotic strains for 84 days, biopreservative actions without the presence of pathogenic contaminants, as well as presented assured microbiological quality and adequate consumption conditions since they are within the defined standards. by legislation.

Keywords: meat product, lactic acid bacteria, predictive modeling.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1 - Fluxograma do processo produtivo do embutido fermentado tipo salame..... | 18 |
| Figura 2 - Curva típica do crescimento microbiano em relação ao tempo..... | 35 |
| Figura 3 - Curva da velocidade específica de crescimento em relação ao tempo | 36 |
| Figura 4 - Curva de crescimento típica de microrganismos em alimentos. | 37 |
| Figura 5 - Simulação do modelo de Baranyi e Roberts (1994)..... | 40 |
| Figura 6 - Parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada .. | 45 |
| Figura 7 - Fluxograma do processamento do embutido fermentado tipo salame de carne de ovino..... | 54 |
| Figura 8 - Etapas do processamento do embutido fermentado tipo salame de carne de ovino probiótico. | 55 |
| Figura 9 - Curva de pH durante o tempo de armazenamento dos embutidos fermentados | 87 |
| Figura 10 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Gompertz para <i>L. paracasei</i> | 101 |
| Figura 11 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Baranyi e Roberts para <i>L. paracasei</i> | 101 |
| Figura 12 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Gompertz para <i>L. casei</i> | 102 |
| Figura 13 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Baranyi e Roberts para <i>L. casei</i> | 102 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição das formulações de embutidos fermentados com inoculação de <i>Lactobacillus</i> | 52 |
| Tabela 2 - Condições operacionais de processo de fermentação e maturação de embutidos fermentados cárneos. | 53 |
| Tabela 3 - Controle do pH durante o processamento do salame | 67 |
| Tabela 4 - Resultados da avaliação microbiológica realizada na amostra de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina no tempo 0 após maturação | 70 |
| Tabela 5 - Resultados da avaliação microbiológica realizada na amostra de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina no tempo 84. | 70 |
| Tabela 6 - Composição físico-químicas de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina..... | 73 |
| Tabela 7 - Composição físico-químicas de embutido fermentado tipo salame de carne ovina..... | 74 |
| Tabela 8 - Análises de umidade e atividade de água realizada nas amostras de embutidos fermentados tipo salame..... | 82 |
| Tabela 9 - Evolução do pH realizadas nas amostras de embutidos fermentados tipo salame | 86 |
| Tabela 10 - Contagem de bactérias ácido-lácticas ao longo do <i>shelf-life</i> dos embutidos fermentados tipo salame até o dia 28 de estocagem..... | 90 |
| Tabela 11 - Contagem de bactérias ácido-lácticas ao longo do <i>shelf-life</i> dos embutidos fermentados tipo salame a partir do dia 42 de estocagem | 90 |
| Tabela 12 - Cinética do crescimento populacional dos probióticos até o dia 28 de estocagem em horas..... | 96 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 13 - Cinética do crescimento populacional dos probióticos a partir do dia 42 de estocagem em horas..... | 97 |
| Tabela 14 - Parâmetros estabelecidos a partir da equação do modelo de Baranyi e Roberts e modelo de Gompertz para o <i>L. casei</i> | 97 |
| Tabela 15 - Parâmetros estabelecidos a partir da equação do modelo de Baranyi e Roberts e modelo de Gompertz para o <i>L. paracasei</i> | 98 |
| Tabela 16 - Dados experimentais e ajustados pelo modelo de Gompertz para <i>L. paracasei</i> | 98 |
| Tabela 17 - Dados experimentais e ajustados pelo modelo de Baranyi e Roberts para <i>L. paracasei</i> | 99 |
| Tabela 18 - Dados experimentais e ajustados pelo modelo de Gompertz para <i>L. casei</i> | 99 |
| Tabela 19 - Dados experimentais e ajustados pelo modelo de Baranyi e Roberts para <i>L. casei</i> | 100 |
| Tabela 20 - Parâmetros de validação matemáticas dos modelos primários às curvas de crescimento do <i>L. casei</i> no período de armazenamento à temperatura de 4°C..... | 104 |
| Tabela 21 - Parâmetros de validação matemáticas dos modelos primários às curvas de crescimento do <i>L. paracasei</i> no período de armazenamento à temperatura de 4°C..... | 104 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BAL – Bactérias ácido-lácticas.

BAR – Modelo de Baranyi e Roberts.

BPF – Boas Práticas de Fabricação.

BPS – Boas Práticas de Segurança.

GOM – Modelo de Gompertz.

IAL – Instituto Adolfo Lutz.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MSE – “*Mean Square Error*” – Erro Quadrático Médio.

NMP – Número Mais Provável.

RMSE – “Root Mean Square Error” – Erro Quadrático Médio da Raiz.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos.

UFC – Unidade Formadora de Colônia.

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco.

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL | 13 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 14 |
| 3.1. CARNE DE OVINO | 14 |
| 3.2. EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME | 15 |
| 3.3. PROCESSAMENTO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME 18 | |
| 3.4. ALIMENTOS FUNCIONAIS | 20 |
| 3.5. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS | 22 |
| 3.6. PROBIÓTICOS | 27 |
| 3.6.1. <i>Lactobacillus</i> | 30 |
| 3.6.1.1. <i>Lactobacillus casei</i> | 31 |
| 3.6.1.2. <i>Lactobacillus paracasei</i> | 32 |
| 3.7. MODELAGEM PREDITIVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO..... | 34 |
| 3.8. MODELO MATEMÁTICO DE BARANYI E ROBERTS..... | 39 |
| 3.9. MODELO MATEMÁTICO DE GOMPERTZ..... | 43 |
| 3.10. VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS..... | 46 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 50 |
| 4.1. PREPARO DO MATERIAL | 50 |
| 4.1.1. Obtenção da carne de cordeiro e toucinho | 50 |
| 4.1.2. Obtenção das amostras Bacterianas de Referência | 50 |
| 4.1.3. Ativação dos Inóculos | 50 |
| 4.2. PRODUÇÃO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME | 51 |
| 4.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS E SUAS DILUIÇÕES..... | 55 |
| 4.4. CONTAGEM DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS | 55 |
| 4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS | 56 |
| 4.5.1. pH | 56 |
| 4.5.2. Acidez Titulável | 57 |
| 4.5.3. Lipídeos | 57 |

| | |
|--|-----|
| 4.5.4. Umidade | 58 |
| 4.5.5. Cinzas | 58 |
| 4.5.6. Proteínas | 59 |
| 4.5.7. Carboidrato e valor calórico | 61 |
| 4.6. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS | 61 |
| 4.6.1. <i>Salmonella</i> | 62 |
| 4.6.2. <i>Clostridium perfringens</i> | 62 |
| 4.6.3. <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> | 63 |
| 4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 64 |
| 4.8. CURVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO | 65 |
| 4.9. MODELAGENS E VALIDAÇÕES MATEMÁTICAS | 65 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 67 |
| 5.1. PRODUÇÃO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME | 67 |
| 5.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS..... | 69 |
| 5.3. ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS | 72 |
| 5.3.1. Determinação de umidade e atividade de água | 81 |
| 5.3.2. Determinação de pH..... | 85 |
| 5.4. CONTAGEM DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS | 89 |
| 5.5. APLICAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS | 94 |
| 5.5.1. Cinética das bactérias ácido-lácticas | 96 |
| 5.6. VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS..... | 104 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 107 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 108 |

1. INTRODUÇÃO

A qualidade de vida está diretamente ligada ao tipo de alimentação de cada ser humano. Assim, ao longo dos anos uma das prioridades da população são as mudanças no estilo de vida e hábitos alimentares, buscando incessantemente desta forma uma saúde melhor e o aumento da expectativa de vida. Considerando que alimentação saudável é aquela que atende todas as exigências do corpo, com a presença de nutrientes e sem excessos que causam malefícios a longo prazo (LIMA JUNIOR, 2020). Este fator tem contribuído na busca de alternativas do consumo e produção de alimentos mais saudáveis que possam trazer benefícios à saúde. Neste meio, encontram-se os produtos chamados de alimentos funcionais, os quais vêm assumindo um grande espaço na vida dos consumidores (PINHEIRO *et al.*, 2013)

Os benefícios relacionados aos alimentos funcionais apresentam os seguintes aspectos: saúde do trato gastrointestinal, aumento da imunidade, prevenção das doenças cardiovasculares; prevenção de câncer, sensibilidade à insulina e controle da diabetes; saúde dos ossos e prevenção da osteoporose além da performance mental e física. O mercado dos alimentos funcionais é denominado por produtos que influenciam positivamente a saúde intestinal e, dentro destes, os produtos adicionados de cultura probiótica, os quais contém uma elevada aceitabilidade (AMBALAM *et al.*, 2016; DUBEY *et al.*, 2016).

Dentro deste contexto, admite-se que a ingestão de bactérias ácido lácticas, fazendo parte da alimentação funcional, proporcione resultados benéficos ao longo do tempo de consumo. Esses microrganismos, chamados probióticos, quando presente nos alimentos, classificam-no em “alimentos funcionais” e, devido suas ações benéficas ao organismo humano, contribuem para a prevenção de infecções e intoxicações intestinais, redução da taxa do colesterol LDL, bem como efeito anticarcinogênico. Estes ainda melhoram a digestão e absorção dos nutrientes pelas células intestinais do consumidor (VIEGAS *et al.*, 2010).

Existem muitos os gêneros de bactérias com alegações probióticas, dentre eles, os *Lactobacillus* e Bifidobactérias que estão relacionados com a redução do risco de alergias de origem alimentar. Estes são capazes de induzir a quebra de proteínas alergênicas no organismo na região do trato gastrointestinal, diminuindo assim os riscos de desenvolvimento de alergias na população (MORAIS; JACOB, 2006). As bactérias ácido-lácticas (BAL) também agem na bioconservação e tem grande influência nas características sensoriais de vários alimentos, contribuindo para melhora de sua textura, sabor, odor e estabilidade de produtos fermentados através da síntese de exopolissacarídeos, como por exemplo, os derivados de leite e carnes (SOUZA *et al.*, 2007).

Dentre as principais indústrias de alimentos, a indústria de carnes e derivados vem se mostrando aberta a desenvolver produtos neste ramo buscando uma maior competitividade no mercado. A carne de ovino e seus derivados constituem um grupo de alimentos de alto valor nutricional, tendo em vista que são fontes ricas em proteínas, apresentando um elevado valor biológico, contendo diversas vitaminas, minerais, boa relação ômega-6:ômega-3 e um pouco de vitamina C (BERCHIELLI *et al.*, 2011). Além disso, contém diversos benefícios ao organismo humano, como o fortalecimento do sistema imunológico, que está diretamente relacionado à redução de doenças como o câncer e a anemia (BURIN *et al.*, 2016).

Os produtos derivados de carnes podem ser facilmente contaminados e deteriorados por bactérias por apresentarem características intrínsecas e extrínsecas, como elevado teor de nutrientes, temperatura, pH e atividade de água favoráveis ao crescimento de microrganismos (SADE, 2011). Dentre os mais comumente consumidos, têm-se os embutidos fermentados tipo salame, os quais além de apresentar condições ideais para o desenvolvimento de patógenos, também apresentam características adequadas para a multiplicação de bactérias ácido-lácticas, que podem estar presentes naturalmente neste produto, ou podem ser inoculadas durante a formulação com o intuito de transformá-lo em um alimento funcional, visto que normalmente são utilizados na formulação, aditivos químicos como nitrito e

nitrito que ao longo do tempo podem ser cancerígenos ao organismo (BRASIL, 2001).

Diante disso, ao inocular as BAL, podem apresentar função bioconservadora devido à produção de bacteriocinas que inibem microorganismos indesejáveis, como *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Campylobacter jejuni*; caso permaneçam em quantidade viável e suficiente para estarem ativas durante todo o processo de fabricação e durante a passagem pelo trato gastrointestinal (SEBRANEK; BACCUS, 2007; GOVENDER *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2015). Podendo apresentar atividade antagonista contra microorganismos indesejáveis, o que permite uma importante perspectiva tecnológica na utilização desses microorganismos na conservação e controle de patógenos em alimentos (FERNANDES *et al.*, 2015; GASPAR *et al.*, 2013).

Como auxílio na conservação existe alguns métodos, como a utilização da fermentação durante o processamento, o qual se caracteriza por diversas alterações bioquímicas, biofísicas e microbiológicas, tendo como complemento na garantia da qualidade do produto final, O processamento desses produtos tem como princípio básico a utilização de métodos combinados de preservação, permitindo a obtenção de um produto estável a temperatura ambiente (MACEDO *et al.*, 2011). Além disso, o uso de probióticos permite a redução dos sais de cura (nitritos e nitratos), diminuindo, assim, a possibilidade de formação das nitrosaminas, que são substâncias potencialmente carcinogênicas (SEBRANEK; BACUS, 2007). Com isso existe cada vez mais a necessidade de entender a incorporação dessas bactérias em produtos alimentícios e seu efeito ao longo do seu crescimento.

É através do campo da microbiologia preditiva que se estuda o crescimento microbiano do alimento por meio das condições ambientais, sendo uma das principais ferramentas responsáveis por mensurar a segurança alimentar (HUANG, 2014). Sendo assim, a disponibilidade de diferentes modelos matemáticos para representar o crescimento microbiano deve ser considerada para a escolha do modelo mais adequado para um uso específico, bem como faz-se necessário o uso de modelos simples para que não haja

comprometimento na exatidão dos ajustes e aplicação de validação matemática para garantir a viabilidade e qualidade assegurada do alimento inoculado de cepas microbianas a ser estudado (CEPEDA *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar um embutido fermentado “tipo salame” de ovino e avaliar a inoculação e o desenvolvimento de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* na qualidade nutricional, físico-química, microbiológica e tempo de vida útil de um embutido fermentado tipo salame de ovino.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um embutido fermentado à base de carne de cordeiro inoculado com bactéria ácido-láctica com provável alegação probiótica;
- Avaliar as características físico-químicas do embutido;
- Avaliar as características microbiológicas dos embutidos;
- Avaliar o tempo de vida útil das formulações realizadas com a variação dos probióticos inoculados;
- Analisar através de modelos matemáticos o crescimento microbiano e da viabilidade dos probióticos durante a vida útil dos produtos;
- Validar através equações matemáticas aplicadas nos modelos, o tempo de vida útil dos produtos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. CARNE DE OVINO

No Brasil, a ovinocultura de corte é uma atividade considerada promissora, não apenas devido ao aumento de carne dessas espécies para consumo, mas também pela possibilidade de produção para o comércio nacional e internacional (GARCIA; LEOPOLDINO JÚNIOR, 2018). A criação de ovinos se sobressai principalmente na economia do Nordeste do Brasil, devido a elevada capacidade de adaptação desses animais às condições climáticas do semi-árido, bem como a ampla diversidade de produtos que podem ser explorados comercialmente (carne, pele, leite e derivados). Além disso, a demanda de carne ovina e caprina nos países em desenvolvimento vem evoluindo ao longo dos anos pelo crescimento demográfico, urbanização e variações das preferências e dos hábitos alimentares do consumidor.

O crescimento dos rebanhos no Brasil ocorre principalmente pelo aumento da demanda interna da carne ovina, como produto substituto para carnes mais comumente consumidas como de frango e bovina, por exemplo. Entretanto, a importação dessa carne já está em alta desde 2000 com volume crescente ao longo dos anos (VEINA *et al.*, 2015). Atualmente no Brasil o consumo de carne de ovinos se mantém em média de 0,6 kg por pessoa por ano, bem como produz em média cerca de 93.000 toneladas do produto sendo necessária a importação de mais 7.000 toneladas para atender o mercado interno (ESTURRARI, 2017).

Essa atividade ainda constitui um fator de geração de renda, além de fonte de proteína na dieta alimentar da população da zona rural (NOGUEIRA FILHO *et al.*, 2010). Devido aos novos hábitos alimentares que estão sendo adquirido pelos consumidores, o crescimento da demanda pela carne ovina e seus derivados vêm sendo favorecido (SAÑUDO *et al.*, 2013).

Para que esta prática evolua mais, a qualidade e características sensoriais das carnes que chegam ao consumidor é um fator primordial. Carne de cordeiro vem sobressaindo ao longo do tempo, por apresentarem características sensoriais como sabor e aroma diferenciados e atrativos, bem

como por seu valor nutricional, alcançando assim um maior valor de mercado (LIMA, 2009). Sua maior aceitabilidade no mercado consumidor ocorre devido a sua característica mais macia e rosada, textura lisa, consistência firme e menor teor de gordura (OSÓRIO *et al.*, 2009). Entretanto, alguns fatores podem influenciar na composição centesimal da carne, as quais podem ocorrer variações em virtude do sexo, raça, idade, tipo de músculo e a nutrição fornecida (MORENO *et al.*, 2016).

A qualidade nutricional da carne de ovino se caracteriza por ser um produto rico em proteínas, apresentando um elevado valor biológico, contendo todas as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), além das hidrossolúveis do complexo B (tiamina, riboflavina, nicotinamida, piridoxina, ácido pantotênico, ácido fólico, niacina, cobalamina e biotina), minerais, ácido linoléico conjugado, boa relação ômega-6:ômega-3 e um pouco de vitamina C (BERCHIELLI *et al.*, 2011). Além disso, contém diversos benefícios ao organismo humano, os quais são proporcionados ao longo do consumo deste tipo de carne, como o fortalecimento do sistema imunológico, que está diretamente relacionado à redução de doenças como o câncer e a anemia (BURIN *et al.*, 2016).

Diante disso, uma forma de diversificar, difundir e agregar valor à carne ovina seria a produção de produtos tipo embutidos fermentados. O processamento da carne de cordeiros é uma prática que agrega valor ao produto, na medida em que são utilizados cortes não aproveitados para o consumo *in natura*, gerando maiores alternativas de comercialização. Isso possibilita o desenvolvimento da industrialização de produtos derivados, aumentando a receita e as opções de compra do consumidor.

3.2. EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), embutidos são os produtos cárneos elaborados com carnes ou com órgãos comestíveis, curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, tendo como envoltório a tripa, a bexiga ou outra membrana animal (BRASIL, 2017).

As características de qualidade e a identidade dos salames são regulamentadas também pela Instrução Normativa nº 22 (BRASIL, 2000). As características sensoriais de textura, cor e odor dos embutidos devem ser considerados característicos e as principais características físicas e químicas são: atividade de água máxima de 0,92; umidade máxima de 40%; gordura máxima de 35%; carboidratos totais no máximo de 1,5% e proteína mínima de 20%. Em relação à qualidade microbiológica, a legislação vigente que se aplica compreende as seguintes análises: *Salmonella*: ausência em 25 g de produto; *Escherichia coli*: 5×10^2 /g de produto e *Staphylococcus coagulase* positiva: 5×10^3 /g de produto (ANVISA, 2019).

Os embutidos fermentados utilizam o processo de fermentação como meio de conservação, podendo apresentar adição de condimentos, antioxidantes e sais de cura para prolongar a vida útil dos mesmos. O processo de fermentação se caracteriza por diversas alterações bioquímicas, biofísicas e microbiológicas, os quais são responsáveis pela preservação do alimento, melhorando a segurança microbiológica e promovendo estabilização da cor e textura, bem como retardamento da oxidação (CARVALHO, 2010; CHAVES, 2013; MAFRA *et al.*, 2020;). Estes produtos cárneos se caracterizam pelo baixo teor de umidade, atividade de água e quando comparado com os demais embutidos, se diferenciam devido ao alto índice de ácido láctico, o qual proporciona sabor forte e característico aos produtos (SANTA *et al.*, 2014). No produto final, para garantir a qualidade deve-se manter uma temperatura inferior a 26°C, pois a temperatura muito elevada pode ocasionar problemas relacionados à segurança microbiológica do produto, fusão das gorduras e excessiva acidificação (MACEDO *et al.*, 2008).

Este tipo de produto apresenta elevada estabilidade quando comparados a outros produtos derivados cárneos, isto se deve a diversos fatores durante o processamento dos embutidos que tem a capacidade de atuar como obstáculos ao desenvolvimento microbiano indesejado. Os embutidos cárneos fermentados são produtos que passam uma fermentação rápida seguida de uma desidratação parcial, o qual ocorre devido à acidificação que induz as proteínas miofibrilares da carne a atingir o ponto isoelétrico, ocorrendo desta forma a liberação de água (BIASI, 2010; CASSOL, 2018).

A utilização de culturas *starters* na fabricação dos embutidos fermentados é fundamental, pois as mesmas são responsáveis por uma fermentação mais rápida e eficaz, produção de ácido láctico a partir dos açúcares presentes na massa cárnea, que a partir disso, conseqüentemente reduzem o pH e solubilização das proteínas, proporcionando um produto com melhores características sensoriais, químicas e microbiológicas. A partir das diversas alterações associadas, o produto final se obtém de forma mais segura e maior qualidade (ERTÜRKMEN *et al.*, 2016; KNAPIK *et al.*, 2017).

Alguns fatores contribuem para as características sensoriais do embutido, são eles: o tipo de matéria-prima, condimentos, cultura iniciadora, processo de defumação, secagem e adição de sais de cura. Durante o processo de fermentação, é onde ocorre a liberação do ácido láctico, que é o principal responsável do sabor do salame, juntamente com os produtos resultantes da ação de enzimas proteolíticas e lipolíticas. A partir das reações químicas e enzimáticas que também ocorrem durante a fermentação e maturação do embutido, degradam proteínas em aminoácidos e lipídios em ácidos graxos, sendo os aminoácidos descarboxilados em compostos aromáticos e os ácidos graxos são oxidados e transformados em aldeídos, álcoois e cetonas, os quais são compostos voláteis que contribuem ainda mais para o sabor e aroma característicos do salame (LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006; VEDOVATTO *et al.*, 2019; SANTA *et al.*, 2014).

Os embutidos cárneos no geral são vistos como produtos que apresentam elevado teor de gordura animal e presença de diversos aditivos combinados, constituindo um problema para consumidores cada vez mais preocupados com a saúde. Entretanto, a gordura contribui para o sabor, textura e aparência de embutidos cárneos, por este motivo, a redução desse ingrediente pode alterar as características sensoriais e a aceitação do produto final (MUGUERZA *et al.*, 2002). Nesse sentido, introduzir microrganismos probióticos no processo fermentativo auxilia no processo de conservação além de aumentar os benefícios presentes no produto final, como produção de compostos antimicrobianos, redução de substâncias tóxicas dos patógenos e benefícios à saúde do consumidor, transformando assim, o mesmo em um

alimento de fonte mais saudável considerado funcional ao organismo humano (LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006; BEM SLIMA *et al.*, 2017).

3.3. PROCESSAMENTO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME

Os processos de fermentação além de manter a durabilidade dos produtos cárneos, aumentam a segurança do alimento pela degradação de compostos tóxicos como aflatoxinas e cianogênio ou pela produção de substâncias antimicrobianas, tais como ácido láctico, bacteriocinas, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio e etanol, que auxiliam na inibição ou eliminação de microrganismos patogênicos presentes nos alimentos (HOLZAPFEL, 2002; MOTARJEMI, 2002).

O fluxograma de fabricação de embutido fermentado tipo salame é formado por 6 etapas, conforme a Figura 1:

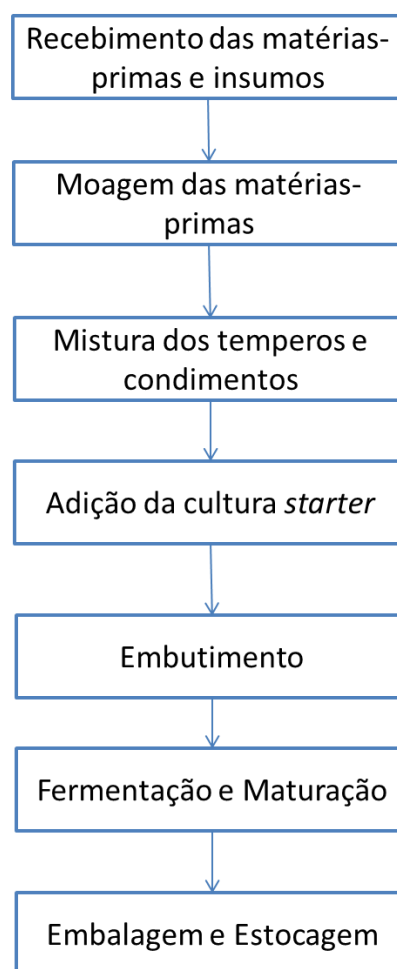


Figura 1 - Fluxograma do processo produtivo do embutido fermentado tipo salame
Fonte: (CASSOL, 2018)

O processo de fabricação do embutido fermentado tipo salame consiste de 3 principais etapas: elaboração do salame, fermentação e maturação. A primeira etapa, a elaboração, ocorre por meio da seleção dos ingredientes, pesagem, mistura e embutimento da massa. Os ingredientes comumente adicionados são a carne, toucinho, sal de cura, antioxidante e especiarias. O carboidrato (glicose, sacarose e maltodextrina) também deve ser parte dos ingredientes para servir como substrato para a fermentação realizada pelas culturas *starters* (HAMES; HALLER; GÄNZLE, 2008; HOLCK *et al.*, 2011). Esta cultura adicionada pode ser composta de uma única espécie ou uma mistura de bactérias. Além disso, na massa de embutido após culturas *starters*, podem ser adicionadas de novas cepas bacterianas, como por exemplo, probióticos a fim de promover benefícios extras. A mistura dos ingredientes é embutida em tripa e submetida ao processo de fermentação.

Nas etapas de fermentação e maturação ocorrem reações bioquímicas e físicas, devido ação das bactérias, as quais são heterofermentativas facultativas, que produzem ácido láctico a partir de hexoses, bem como a redução do pH a valores de aproximadamente 5,0, durante os primeiros dias de processamento. Ao longo do processo a quantidade de açúcar se torna escassa na carne, portanto, a adição de glicose ou lactose se faz necessária para garantir substrato suficiente para a fermentação (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003). Esta fase deve ser realizada com temperatura e umidade controladas, para que o desenvolvimento das bactérias ácido-lácticas ocorra de forma adequada (HOLCK *et al.*, 2011). Além disso, nesta etapa ocorrem mudanças significativas que garantem uma melhor segurança e características sensoriais. Sendo algumas dessas mudanças: redução do pH e de cepas microbiológicas patogênicas, aceleração do tempo de fermentação, estabilização da cor desejável, melhoria do sabor e aroma, bem como retardamento da oxidação, permitindo um produto mais uniforme para comercialização (MAFRA *et al.*, 2020).

O embutido deve-se permanecer em câmaras de fermentação e maturação durante 21 a 28 dias, controlando a variação da temperatura e umidade ao longo deste processo de forma adequada, devendo obter a temperatura entre 24 a 43°C e umidade relativa de 85% a 95 % até que o pH

do produto alcance o valor desejado, em torno de 5,0 a 5,4, onde a capacidade de retenção de água é reduzida, favorecendo a secagem e a redução de peso do produto. Durante esta secagem, os embutidos perdem de 30 a 40% do seu peso inicial, sendo a perda gradual para evitar o ressecamento excessivo (BARBOSA *et al.*, 2015; DE CARVALHO *et al.*, 2017).

Na maturação, o embutido deve atingir atividade de água por volta de 0,87 e sua umidade deve ficar em torno de 25-35%, proporcionando a textura característica do produto (HOLCK *et al.*, 2011, KIM *et al.*, 2012). As culturas iniciadoras também apresentam um papel de desenvolver compostos aromáticos durante a maturação, a partir da conversão de peptídeos gerados pela proteólise muscular na fermentação em aminoácidos. Além disso, a lipólise auxilia no desenvolvimento de aroma e sabor através da liberação de ácidos graxos (LEROY; VERLUYTEN; VUYST, 2006). A transformação da formação da cor ocorre de forma gradativa principalmente durante a maturação do produto cárneo fermentado, quando ocorre a redução do nitrato e nitrito à nitrosomioglobina, pigmento responsável pela cor vermelha do embutido.

Ao final do processamento, embutidos fermentados tipo salame devem apresentar baixo valor de pH (4,8-6,2) e baixa atividade de água ($\leq 0,9$) (HOLCK *et al.*, 2011, KIM *et al.*, 2012). Após as etapas de produção, no embutimento, o consumo de oxigênio torna o ambiente microaerófilo e anaeróbio, os quais apresentam condições que favorecem o crescimento das bactérias lácticas que são capazes de produzir substâncias conservadoras na carne (MONFORT, 2002). Além disso, o produto deve conter características sensoriais adequadas e características, sendo os principais fatores que contribuem para o sensorial do embutido: tipo de matéria-prima, condimentos, cultura iniciadora, processo de defumação e secagem e adição de sais de cura.

3.4. ALIMENTOS FUNCIONAIS

Segundo a Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os alimentos podem apresentar alegação de propriedade funcional ou alegação de propriedade de saúde. Neste caso, a propriedade funcional se refere à função metabólica ou fisiológica que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento,

desenvolvimento, manutenção e outras atividades normais do organismo humano. Estes alimentos apresentam capacidade de melhorar as condições do corpo, reduzir ou prevenir o risco de algumas doenças e conseqüentemente, melhorar o bem-estar do consumidor (TUFARELLI; LAUDADIO, 2016).

Diante dos benefícios, nas últimas décadas, a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente pelos consumidores, visto que esses alimentos passaram a ser considerados não somente fontes de nutrientes, mas também promotores de bem-estar e saúde, devido à prevenção de doenças, como diabetes, hipertensão, dislipidemias e neoplasias. Diante disso, estes alimentos também estão relacionados à saúde cardiovascular e à saúde intestinal, ocorridas por meio de modificações no sistema imunológico, com sua funcionalidade relacionada aos componentes bioativos (CRUZ *et al.*, 2017; ASHAOLU, 2020; DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) apresenta a lista de algumas substâncias presentes em alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou saúde, são elas: ácidos graxos, como eicosapentaenóico (EPA) e docosaexaenóico (DHA), que auxiliam positivamente na manutenção dos níveis normais de triglicerídeos; carotenoides como licopeno e luteína, com alegação de ação antioxidante, protegendo as células de danos oxidativos promovidos por radicais livres; fibras alimentares, que auxiliam no funcionamento intestinal; proteína de soja e fitoesteróis, que auxiliam na redução de colesterol; probióticos e prebióticos como a inulina e frutooligossacarídeos (FOS), que contribuem para o equilíbrio da microbiota (ANVISA, 2008).

Para que estas substâncias dos alimentos funcionais sejam eficazes é preciso que seu uso seja regular e também esteja associado ao aumento da ingestão de frutas, verduras, cereais integrais, carne, leite de soja e alimentos ricos em ômega-3 (VIDAL *et al.*, 2011). Com a introdução deste tipo de alimentos a imunidade se fortalece, aumentando a expectativa de vida da população ao longo dos anos. Por esta razão, e a fim de evitar doenças crônicas e graves, os consumidores vêm adotando hábitos alimentares mais saudáveis, buscando um equilíbrio alimentar. Além disso, o interesse à busca

por uma alimentação equilibrada composta por alimentos funcionais mostrou-se cada vez mais necessária, com a intenção de suprir as necessidades básicas do organismo melhorando a qualidade de vida.

Neste contexto, o mercado de alimentos funcionais é predominantemente de produtos contendo bactérias ácido-lácticas probióticas, em função da imagem positiva dos probióticos entre os consumidores devido aos benefícios ao trato gastrointestinal, bem como das características intrínsecas dos alimentos. Por este motivo, a demanda por alimentos funcionais é crescente para desenvolvimento de produtos funcionais com adição de probióticos nas indústrias, os quais apresentam atribuições benéficas à saúde e propriedades organolépticas satisfatórias aos consumidores (BARCELLOS; LIONELLO, 2011; BIGLIARDI; GALATI, 2013).

3.5. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

As bactérias ácido-lácticas (BAL) são os microrganismos responsáveis pela produção de ácido láctico a partir da fermentação de açúcares. Elas têm sido utilizadas por milhares de anos para produção de alimentos como queijo, leites fermentados, embutidos cárneos fermentados, vinhos, cervejas e iogurtes, pois contribuem na biopreservação dos alimentos, melhoram as propriedades nutricionais e sensoriais como sabor, odor e textura, sendo selecionados de acordo com o carboidrato a fermentar, os quais normalmente são a glicose, sacarose ou lactose. Obtém a capacidade de conferir textura ao produto, pois como função a produção de *flavour* diferenciado e a desnaturação das proteínas, o que resulta na expulsão da água, a qual é a principal responsável pela textura. Além disso, são muito utilizadas em indústrias e pesquisas com função probiótica a fim de proporcionar melhoria na saúde do consumidor e melhorar a vida útil do produto final (RAMÍREZ, 2011; AZNAR; ZUÑIGA, 2017).

Estas bactérias apresentam a habilidade de melhorar a vida útil do produto devido efeito inibitório do desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patógenos, o qual é atribuído à ação conjunta de diversos metabólitos antimicrobianos que são produzidos durante o processo de fermentação. Entre esses metabólitos, os principais são: ácido láctico, acético e

propiónico, sendo eles responsáveis pela acidificação do meio, interferindo na manutenção do potencial de membrana e conseqüentemente reduzindo o pH intracelular, dessa forma, é capaz de inibir o desenvolvimento de muitos microrganismos patogênicos e esporulados. Ao longo do processo fermentativo são produzindo outros compostos que também apresentam atividade antibacteriana, os quais incluem o dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil, antibióticos e bacteriocinas. Devido a esta atividade antimicrobiana, as BAL permitem uma importante perspectiva tecnológica na aplicação das mesmas em diversos produtos fermentados (GASPAR *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2015).

As bactérias mais utilizadas como ácido-lácticas em alimentos são do gênero: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (RAMÍREZ, 2011; AZNAR; ZUÑIGA, 2017). Esses gêneros de bactérias são as mais utilizadas devido sua predominância na microbiota intestinal, pois quando se encontram em condições adequadas e suficientes, atingem aproximadamente 20% a 40% de sobrevivência ao passar pelo trato gastrointestinal, dessa forma, conseqüentemente, essas bactérias são capazes de oferecer ao consumidor uma melhora nas suas ações funcionais (FERREIRA, 2012).

Em produtos alimentícios, as BAL podem ser adicionadas tanto na matéria-prima, quanto durante o processo de fermentação, agindo como bioprotetor ou bioconservante. Entretanto, sua aplicação apresenta limitações para produtos não fermentados e/ou que passam por processos com temperaturas muito elevadas (MESSAOUDI *et al.*, 2013; PEHRSON, 2013).

São classificadas como bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos, se apresentam na forma de cocos ou bacilos, asporogênicos, não redutores de nitrato a nitrito, gelatinase negativos e incapazes de utilizar o lactato. Fazem catalase negativa, são tolerantes a ácidos, bem como são anaeróbicas, sacarolíticas, por atuarem nos hidratos de carbono, são fermentativas produzindo grande quantidade de ácido láctico no caso das homofermentativas e, dióxido de carbono, etanol e acetato, no caso das heterofermentativas, apresentam também um pobre metabolismo biossintético,

ou seja, para que ocorra um crescimento o número de nutrientes precisa ser elevado. Por fim, são divididas em mesófilas e termófilas, com temperaturas ótimas em 30°C e 50°C, respectivamente (SALMINEN *et al.*, 2004; FERREIRA, 2005).

As principais características para serem consideradas bactérias-ácido lácticas necessárias são: não serem patógenas, fácil crescimento, geneticamente estável, viável, abundante, ativas e sobreviver a baixo pH, pois precisa se manter viva no nosso organismo, tendo em vista o pH do estômago próximo a 2. Possuem a capacidade de inibir culturas indesejáveis e/ou patógenas também por meio da competição por oxigênio e proteínas antimicrobianas (DE MARTINS *et al.*, 2003). Além disso, contribuem no valor nutricional e segurança microbiológica e, por este motivo são amplamente utilizadas em produtos alimentícios (VIEGAS *et al.*, 2010).

Essas bactérias ácido-lácticas (BAL) podem ser encontradas em uma grande variedade de alimentos fermentados, principalmente os derivados de carnes. Apresentam status GRAS (Generally Recognized as Safe) – “Geralmente Considerados Seguros”, bem como por proporcionar o benefício de aumentar a segurança e o prazo de validade dos mesmos. Sua ação antagonista frente a microrganismos patógenos ocorre principalmente com os as principais bactérias encontradas em alimentos e perigosas para saúde como *Clostridium Botulium*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* (RAMÍREZ *et al.*, 2011). Dentre estes microrganismos, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* são encontrados facilmente em produtos cárneos, pois apresentam a capacidade de deteriorar facilmente estes alimentos e apresentar toxicidade ao organismo humano no momento do consumo. Isto acontece, pois as carnes contém características intrínsecas, como nutrientes, atividade de água e pH favoráveis para desenvolvimentos destes microrganismos (SADE, 2011).

As BAL apresentam também outras características importantes para saúde, como a redução dos riscos de intoxicação, redução da intensidade de tratamentos físicos e redução de conservadores sintéticos. As mesmas, ao entrarem em contato com o intestino, colonizando-o, constituem um grupo conhecido das bactérias probióticas, cujas atividades são largamente

conhecidas quanto aos diversos benefícios proporcionados à saúde do consumidor (FERREIRA, 2012; COSTA, 2016).

3.6. CULTURAS INICIADORAS

Desde a antiguidade produzem-se alimentos fermentados, entretanto, os primeiros alimentos fermentados foram obtidos por fermentação espontânea, a partir do desenvolvimento da microbiota presente naturalmente na matéria-prima utilizada para cada produto. Porém, ao longo dos anos e devido à evolução científica e tecnológica, a fabricação atual de produtos fermentados envolve a utilização de culturas iniciadoras específicas, previamente selecionadas de acordo com a especificidade de cada uma, bem como a habilidade de promover segurança alimentar ao produto, aumentando a vida útil e melhorando a qualidade do produto final (BEM SLIM *et al.*, 2017).

As culturas desses microrganismos, puras ou mistas, são preparações de microrganismos vivos, compostos normalmente por bactérias ácido lácticas, as quais desenvolvem uma atividade metabólica desejável no produto. As mesmas estão disponíveis comercialmente, especialmente nas formas congelada ou liofilizada, que são selecionadas de acordo com a finalidade de utilização. Quando introduzidas na formulação de produtos fermentados, permitem uma maior uniformidade, reduzem o tempo de fermentação, aumentam o tempo de conservação e conferem características sensoriais desejáveis (TABANELLI *et al.*, 2012).

Os cultivos usados consistem, comumente, de microrganismos acidificantes como *Lactobacillus spp* ou *Pediococcus spp*, que ao serem utilizados, tem como finalidade acelerar o processo de fermentação e produção do sabor e textura, bem como promover a redução do nitrato a nitrito, em caso de produtos contendo esses componentes, como embutidos cárneos. O uso destes microrganismos auxilia na estabilidade da cor, acidifica o meio e produz um aroma desejável, permitindo a otimização do processo devido a alguns fatores, como por exemplo, produção de bacteriocinas, redução do pH inicial de 5,1 para 4,5 e do teor de nitrito residual (LYOCARNI, 2013; MAFRA *et al.*, 2020).

Os microrganismos das culturas iniciadoras devem apresentar como principais características, o crescimento elevado em concentrações de 6% de cloreto de sódio e de 100 mg/ kg de nitrito, sendo a temperatura ótima de multiplicação entre 20 a 43° C, bem como não deve possuir atividade patogênica ou produzir substâncias tóxicas. Estas culturas podem ser utilizadas em diversos tipos de produtos fermentados, como embutidos cárneos, normalmente acidificantes como, por exemplo, *Lactobacillus*, cuja função é estabilizar o produto de maneira biológica (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001)

Estes microrganismos devem passar por uma seleção prévia apresentando produção de enzimas hidrolíticas durante a fermentação, promovendo desta forma, melhora na qualidade dos alimentos fermentados, proporcionando controle de fermentação e padronização do produto final (KWON, 2018; TAMANG, 2014). Deve-se também levar em consideração as características da matéria-prima, a formulação, atividades metabólicas, tecnologia aplicada e as características finais do produto. Entretanto, fatores ambientais também influenciam diretamente no desenvolvimento da cultura iniciadora, como a temperatura, umidade relativa, pH, NaCl e quantidade de oxigênio, por exemplo (BULTOSA 2015; YAO *et al.*, 2020). Para culturas destinadas a indústria de embutidos cárneos, deve ser tolerante ao sal e ao nitrito, com crescimento em temperatura entre 27 e 30°C, bem como a pH em torno de 5,0. Além disso, não devem produzir sabores nem odores que não sejam característicos do produto e nem descarboxilar os aminoácidos reduzindo a formação de aminas biogênicas (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005; LYOCARNI, 2013).

Os microrganismos atuam sobre o carboidrato, sendo o açúcar o principal ingrediente utilizado para a início da fermentação, cuja queda de pH depende da quantidade de açúcar utilizado na produção, considerando que quanto maior a quantidade deste açúcar, menor o pH final do produto e mais acentuada a acidificação (CIROLINI, 2010). Quando associa-se o açúcar à temperatura de fermentação, determina-se a taxa de formação de ácido lático, conseqüentemente, eleva-se as chances de desenvolvimento de microrganismos responsáveis por promover o sabor, pH e acidez, devido a

isso, estas culturas devem apresentar elevada tolerância a altas concentrações ácidas PRISCO; MAURIELLO, 2016).

A produção do ácido láctico no início da fermentação confere aos produtos melhor qualidade sanitária, devido à inibição de microrganismos indesejáveis como *Salmonella spp*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Campylobacter jejuni*; bem como conferem sabor característico aos produtos (AOAC, 2000; BRASIL, 2000). As culturas são capazes de acelerar o processo de fermentação e maturação, assegurando baixo residual no teor de nitrato e nitrito, bem como desenvolver atividade metabólica desejável, com a finalidade de melhorar sua conservação, segurança e características sensoriais do produto final (TYÖPPÖNEN *et al.*, 2003; CIROLINI, 2010).

3.7. PROBIÓTICOS

De acordo com a resolução RDC nº2/2002, probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Segundo a Legislação Brasileira, os microrganismos considerados probióticos que podem ser agregados aos alimentos para contribuir para o equilíbrio da microbiota são: *L. acidophilus*, *L casei shirota*, *L casei* variedade *rhamnosus*, *L casei* variedade *defensis*, *L paracasei*, *loctococcus lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis*, *B. longum* e *E. faecium* (BRASIL, 2007).

Para que sejam considerados probióticos, inicialmente recomenda-se que contenha no mínimo 10^7 a 10^9 UFC/g de produto, além disso, estes microrganismos devem ser resistentes ao pH ácido, ter capacidade de aderir a mucosa do intestino humano, sobreviver as condições do tubo digestivo, capacidade de produzir substância antimicrobianas que possam inibir o crescimento de microrganismos indesejável e colonizar o intestino (BRASIL, 2007; SAAD *et al.*, 2013; GOVENDER *et al.*, 2014).

Os probióticos apresentam alguns mecanismos de ações, como por exemplo: competição por sítios de ligação, competição por nutrientes, antagonismo direto e estímulo do sistema imune pela ativação dos macrófagos.

Durante a competição por sítios de ligação, as bactérias das cepas probióticas ocupam sítios de ligação presentes na mucosa do intestino que poderiam ser ocupados por bactérias patogênicas, com isso, possibilita a eliminação dos microrganismos patogênicos do trato gastrointestinal. No caso da competição por nutrientes, as mesmas cepas probióticas se nutrem a partir de nutrientes quebrados e disponíveis no lúmen intestinal, dessa forma, promove a redução de nutrientes disponíveis para as bactérias patogênicas consumirem, limitando sua sobrevivência (FREITAS; RABELLO; WATANABE, 2014; SANTOS; MORAES *et al.*, 2018).

Dentre os benefícios oferecidos pelos probióticos, inclui a ação anticancerígena que inibe a formação de tumores na região gastrointestinal, diminuição do colesterol e alívio em alergias alimentares e ainda melhora na intolerância a lactose (ZACARIAS *et al.*, 2011). Este último fato ocorre, pois, a lactose presente no leite é reduzida gradativamente durante o processo de fermentação pelos principais tipos probióticos: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, as quais também apresentam enzimas digestivas e capacidade de proliferação ao atingir o intestino (SHAH, 2007; TRIPATHI; GIRI, 2014). Além disso, quando as culturas estão em condições adequadas de concentração inicial, o controle da microbiota intestinal acontece de forma facilitada. Manter o equilíbrio da microbiota resulta em fatores positivos relacionados a efeitos antagônicos, imunológicos e resistência a patógenos, ou seja, a partir do desenvolvimento de bactérias benéficas, existe a estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, bem como a estimulação do sistema imunológico, alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas, apresentando também, propriedades antimutagênicas e anticancerígenas (HUGO *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2017).

As bifidobactérias fermentam os açúcares, produzindo ácido acético e láctico. Essas bactérias são mais comumente encontradas no intestino e suas propriedades possibilitam a prevenção de colonização de bactérias patogênicas. As espécies mais utilizadas são *Bifidobacterium bifidus*, *B. longus*, *B. animalis* e *B. infantis* (BARBOSA *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2018). No caso do gênero *Lactobacillus*, são colonizadores que estão presentes na boca, trato intestinal e alguns alimentos de origem vegetal e animal. Além disso, são

bactérias gram positivas que não possuem citocromos, não formam esporos e são estritamente fermentativas e anaeróbias, sendo os mais utilizados na indústria alimentícia: *Lactobacillus casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* e *L. plantarum* (GOLDSTEIN; TYRREL; CITRON, 2015).

Culturas probióticas normalmente são utilizadas nos processos alimentícios, pois promovem um melhor sabor nos produtos finais devido à redução da acidez durante o armazenamento e estocagem do mesmo (MACEDO *et al.*, 2011, FREITAS *et al.*, 2014). No caso de embutidos cárneos fermentados, as culturas podem ser adicionadas como parte integrante da cultura starter ou como cultura adicional durante a mistura da massa no processo (MACEDO *et al.*, 2011). Entretanto, para atingir os benefícios desejados devem-se manter vivas até o prazo final de validade do produto contendo uma concentração mínima final de 10^7 UFC/mg ou mL e a porção diária deve ser indicada no rótulo (BRASIL, 2007). Tendo em vista que a concentração de microrganismos presentes e viáveis no alimento influencia na promoção dos benefícios a serem oferecidos.

Para o desenvolvimento destas bactérias com viabilidade celular ao longo do tempo, o produto também deve atender alguns parâmetros que melhorem a sobrevivência desses probióticos, como: faixas de pH e temperatura adequadas, embalagens com barreira de oxigênio, adição de ingredientes antioxidantes, bem como os probióticos devem se mostrar resistentes as operações de processamento e viabilidade no decorrer do armazenamento (SILVA, 2016; MELO *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2019). Além disso, a composição de uma matriz alimentar utilizada para a fabricação de um produto com probióticos é complexa e também apresenta influências na sobrevivência destes microrganismos durante o processamento do produto e nas condições gastrointestinais. O teor de gordura, por exemplo, a concentração de proteínas e carboidratos, bem como as propriedades físico-químicas, como atividade de água e a acidez do alimento, também são fatores que afetam o crescimento e sobrevivência destes microrganismos. Por este motivo faz-se necessário o controle da qualidade, caracterização físico-químicas e microbiológicas, na matéria-prima, durante o processamento e no produto final, a fim de garantir um produto de qualidade e com probióticos

ativos para atuação de seus efeitos benéficos durante o consumo (RANADHEERA *et al.*, 2012).

3.7.1. *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* são bastonetes gram-positivos, não esporulados, que não possuem citocromos, imóveis, anaeróbios ou anaeróbios facultativos, mesófilos, ácidos (com pH ótimo entre 5,5 e 6,2), e ainda, necessitam de nutrientes complexos e presença de CO_2 para auxiliar em seu crescimento (CARDARELLI *et al.*, 2008; BUTEL, 2014). Este gênero compõe o grupo das bactérias ácido-lácticas, responsáveis pela fermentação dos carboidratos tendo como principal produto metabólico o ácido láctico, bem como é considerado heterogêneo, englobando mais de 50 espécies, comumente utilizado para promover benefícios à saúde do consumidor por meio das cepas probióticas (BURITI; SAAD, 2007; BERNADEAU *et al.*, 2008; RAIZEL *et al.*, 2011). Além disso, podem ser encontradas em diferentes ambientes, como cereais, frutas, vegetais, alimentos fermentados, bem como no corpo humano, principalmente nas mucosas oral, intestinal e vaginal (PITHVA *et al.*, 2012).

Estas bactérias apresentam sobrevivência influenciada por fatores ambientais como pH, interações com outros microrganismos e teor de oxigênio presente no meio, apresentam aerotolerância, ou seja, também são capazes de se desenvolver na presença de oxigênio (RAIZEL *et al.*, 2011; ASHRAF; SHAH, 2011; SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Algumas espécies desse grupo tem a capacidade de estimular o espessamento da barreira intestinal pela produção de mucina, colaborando na proteção a infecções e alergias (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

Ao serem aplicadas em produtos alimentícios para consumir, deve-se levar em consideração a composição da matriz alimentar, a qual também influencia na viabilidade e na atividade dessas bactérias, o que são consideradas importantes tendo em vista que as mesmas necessitam sobreviver durante todo o processo do alimento, no produto final até que o prazo de validade encerre, deve resistir à degradação de enzimas hidrolíticas e sais biliares, bem como durante todo o trato gastrointestinal (VASILJEVIC; SHAH, 2008; CARVALHO, 2015).

Dentre os *Lactobacillus* mais utilizados na indústria alimentícia tem-se os *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* devido o poder de sobrevivência e multiplicação no trato gastrointestinal após a ingestão garantindo efeito benéfico ao consumidor (NOVAK *et al.*, 2001; BURITI; SAAD, 2007). Este grupo de *Lactobacillus* é geneticamente heterogêneo e capaz de manter o equilíbrio de vários ambientes, bem como é facultativamente heterofermentativos e compõe aqueles que fermentam hexoses e pentoses em ácido-lático, além de produzir gás a partir de gliconato (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; AXELSSON, 2004; VÁSQUEZ *et al.*, 2005).

Devido à ampla variedade de alimentos que estes grupos podem ser incorporados no processo de fabricação, apresentando elevado valor comercial para novos produtos, pois tem como finalidade conferir aroma, sabor, textura, bem como auxiliar na bioconservação dos alimentos pelo processo de acidificação, a qual ocorre a redução do pH na matéria-prima, a partir da produção do ácido lático (BURITI; SAAD, 2007; TERPOU *et al.*, 2019). Além disso, são classificados por diversas características, como o fato dessas bactérias possuírem atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos, contaminantes e deteriorantes em alimentos (SHOKRYAZDAN *et al.*, 2017).

3.7.1.1. *Lactobacillus casei*

O *Lactobacillus casei* é uma espécie amplamente conhecida, devido à popularização de leites e outros produtos fermentados contendo estas bactérias, desta forma, o mesmo passou a ser estudado para ser inoculado em produtos fermentados de diversas matrizes alimentares, como derivados de leites, carnes e frutas (NIKBAKHT *et al.*, 2016). Na produção e aplicação de produtos fermentados inovadores, o mesmo pode ser utilizado tanto de forma profilática como de forma terapêutica para as afecções associadas ao desbalanço da microbiota intestinal (HILL *et al.*, 2018).

Esta espécie apresenta elevada aplicação em alimentos, principalmente na fermentação, sendo a mesma amplamente aplicada em iogurtes, leites, queijos, salames, sorvetes, geleias e, bebidas de frutas, devido a uma habilidade natural de sobreviver a choques térmicos aplicados em

diversos métodos conservativos (RANADHEERA *et al.*, 2012; GARCÍA-CEJA *et al.*, 2015; REALE *et al.*, 2015; DIMITRELLOU *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2016). Algumas cepas desta espécie são capazes de produzir substâncias bacteriocinas termoestáveis e biosurfactantes, promovendo a possibilidade de aplicação como bioconservante em alimentos durante o prazo de validade, podendo inibir principalmente bactérias gram negativas patogênicas devido a redução do pH (ANNUK, 2003; SHARMA; SAHARAN, 2014). Além disso, ao ser aplicada em alimentos, também apresentam como vantagem a elevada resistência ao pH ácido, principalmente na fabricação de produtos fermentados, bem como ao suco gástrico e entérico do estômago (LI *et al.*, 2013).

O *L. casei* tem aplicação como probiótico utilizado na fermentação principalmente como culturas responsáveis pela aceleração do desenvolvimento do sabor em determinadas variedades de alimentos. Além disso, ao serem ingeridos de forma contínua e regular, mostrou-se eficaz contra tumores de bexiga e contra metástases, podendo inibir o aumento da atividade mutagênica. Esta espécie também beneficia o aumento da microbiota intestinal presente naturalmente, impedindo a proliferação dos microrganismos nocivos no trato digestivo. A mesma pode ser indicada para tratamento da diarreia e fezes amolecidas, obstipação, restauração da microbiota intestinal e controlar o excesso de gases, além de apresentar melhorias na digestão e reduzir a intolerância ao leite (REINERT, 2000).

As espécies de *Lactobacillus casei* são mais efetivas quando comparadas com muitas outras bactérias em diversos alimentos, pois apresentam capacidade de sobrevivência e multiplicação durante a passagem pelo trato intestinal, afim de colonizar de forma efetiva o trato digestivo e balancear a microflora intestinal, devido a resistência ao ácido gástrico e bile, aderindo a mucosa do intestino, sendo assim, eficientes na luta contra patógenos potenciais, tais como: *E. coli*, *Streptococci*, *Clostridium*, *Salmonella* e *Shigella*. Além disso, apresentam efeitos benéficos ao consumidor, bem como conferem aroma, sabor e textura aos alimentos (REINERT, 2000; SIDIRA *et al.*, 2015).

3.7.1.2. *Lactobacillus paracasei*

As culturas probióticas presentes em um alimento compostas por *L. paracasei* é capaz de inibir o crescimento de *Listeria* durante a passagem pelo trato gastrointestinal, bem como um possível efeito protetor presente na massa do salame sobre a mucosa intestinal durante o consumo, responsável por formar uma cápsula e envolver a bactéria patogênica, impedindo a adesão e colonização da mesma no intestino humano, podendo haver a eliminação do patógeno através das fezes. Além disso, esta cápsula protege este probiótico das ações adversas do trato digestivo, mantendo vivo por mais tempo no organismo humano e atuando nos processos inflamatórios (BENGOA *et al.*, 2018; BENGOA *et al.*, 2019).

Em geral, estas bactérias são utilizadas na fermentação de produtos lácteos e cárneos, como o salame, para isso, as mesmas devem produzir ácido láctico e provocar redução do pH próximos a 5,0 durante os primeiros dias de processamento. Entretanto, a carne apresenta insuficiência de açúcares, por este motivo a adição de glicose ou lactose se faz necessária para garantir quantidade suficiente de substrato para a fermentação (TYÖPPÖNEN; PETÄJÄ; MATTILA-SANDHOLM, 2003).

O *L. paracasei* se caracteriza por se desenvolver em temperaturas entre 15 e 45°C, não apresentar motilidade e produzir ácido láctico principalmente a partir de frutose, galactose, glicose, maltose (SCARIOT, 2020). Além disso, são capazes de apresentar defesa contra compostos oxidantes, contendo dessa forma ação antioxidante, a qual pode ser utilizada para diminuir os efeitos maléficos de radicais livres no organismo, bem como apresentam também atividade inibitória contra bactérias patogênicas, com ação efetiva ao longo de todo trato gastrointestinal, principalmente devido a camada protetora que formam no intestino impedindo o desenvolvimento dos patógenos e processos inflamatórios, mostrando também um crescimento estável sob diferentes condições de disponibilidade de oxigênio (ANNUK *et al.*, 2003; BENGOA *et al.*, 2019).

As cepas de *Lactobacillus paracasei* obtêm elevadas propriedades de ações benéficas à saúde, a nível intestinal, como fortalecimento e equilíbrio da mucosa e barreira a atuação de microrganismos patogênicos, por este motivo

são comumente aplicados como probióticos em produtos fermentados lácteos ou cárneos, principalmente (DI CERBO; PALMIERI, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Além dos benefícios gastrointestinais, os mesmos podem atuar contra *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, um dos principais patógenos dos derivados cárneos, atuando também na prevenção de diarreias ou de outros transtornos intestinais (BENDALI *et al.*, 2011). A cepa também apresenta capacidade de sobrevivência a baixo pH, tolerando inclusive altas concentrações da bile, bem como eficácia no tratamento contra hipertensão e hipercolesterolemia. Diante desses diversos benefícios, a aplicação dessas bactérias está sendo cada vez mais utilizadas matrizes alimentares (CHIANG; PAN, 2012; PROVEDA *et al.*, 2015).

3.8. MODELAGEM PREDITIVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO

O comportamento dos microrganismos, bem como seu crescimento, sobrevivência e morte, deve-se através das propriedades dos alimentos e parâmetros que os mesmos podem afetar o desenvolvimento microbiano, tanto por meio de fatores intrínsecos, como a atividade de água, potencial oxi-redutor e pH, quanto pelos fatores extrínsecos dados pela temperatura, umidade relativa e atmosfera (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

Estudar os comportamentos microbianos se torna fundamental frente às mudanças dos parâmetros ambientais, pois, por meio disto, é possível obter maiores conhecimentos sobre os microrganismos e seu desenvolvimento. Com isso, inicia-se a microbiologia preditiva, a qual pode ser classificada como uma área de pesquisa que utiliza modelos matemáticos para descrever o processo de crescimento e sobrevivência dos microrganismos que podem ser submetidos a diversas mudanças físicas, químicas e biológicas durante o processamento, transporte, distribuição e armazenamento dos alimentos (HUANG, 2014). A partir da utilização e aplicação da microbiologia preditiva, torna-se mais fácil a explicação do comportamento microbiano diante das modificações de fatores ambientais, como temperatura, pH, Aw e a variedade genéticas dos microrganismos, tendo como finalidade analisar o aumento da multiplicação microbiana, garantindo a qualidade do produto e, desta forma,

evitar riscos à saúde do consumidor (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013; VASCONCELOS, 2017).

O crescimento microbiano em sua maioria apresenta fases distintas. Na fase inicial, a velocidade específica do crescimento se inicia com um valor próximo de zero, aumentando gradativamente após certo tempo para um valor máximo. E então esta velocidade decresce gradativamente até se aproximar novamente de zero, quando se atinge um valor assintótico no crescimento microbiano. Quando a curva de crescimento é apresentada através do logaritmo da contagem microbiana em função do tempo, as variações da velocidade resultam em uma curva sigmoideal (ZWIETERING *et al.*, 1990).

Nas Figuras 2 e 3 estão apresentadas, respectivamente, uma curva típica de crescimento microbiano, e a respectiva curva da velocidade específica de crescimento em relação ao tempo.

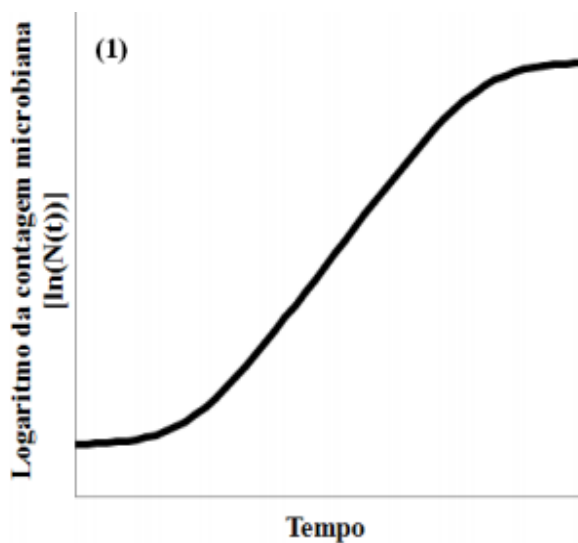


Figura 2 - Curva típica do crescimento microbiano em relação ao tempo
Fonte: (ZWIETERING *et al.*, 1990)

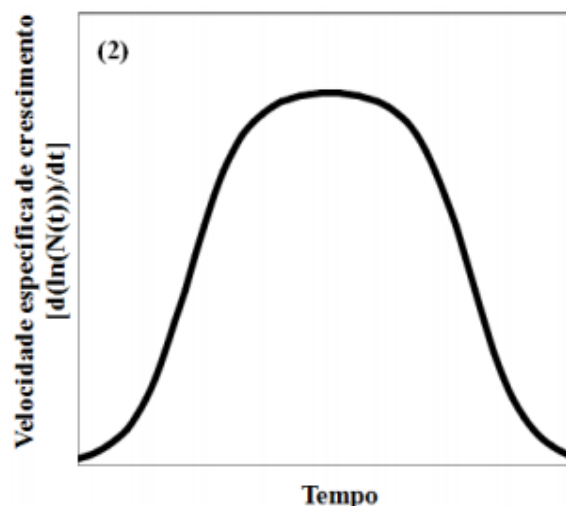


Figura 3 - Curva da velocidade específica de crescimento em relação ao tempo
Fonte: (ZWIETERING *et al.*, 1990)

No crescimento microbiano em alimentos são observadas 4 fases que são analisadas nos modelos preditivos: a fase *lag*, na qual o microrganismo está se adaptando ao meio, a fase exponencial, na qual o microrganismo já está adaptado ao ambiente em que está exposto e direciona todo o seu metabolismo para a reprodução, a fase estacionária, cuja começam a apresentar escassez de nutrientes e a taxa de reprodução é equivalente à taxa de mortes, e por fim, a fase de declínio, cuja os microrganismos produzem toxinas e o número de mortes se sobrepõe a quantidade de novos microrganismos (ROBAZZA, 2010; SCHLEI, 2018). Sendo o processo de deterioração dos alimentos decorrente da multiplicação de microrganismos, sendo demonstrada em maior escala durante as fases *lag* e exponencial. Estas fases são mostradas na Figura 4.

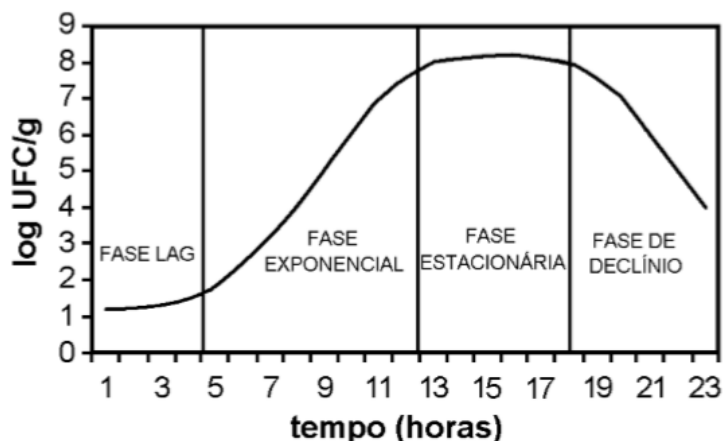


Figura 4 - Curva de crescimento típica de microrganismos em alimentos.

Fonte: (ROBAZZA, 2010)

Além das 4 fases, os modelos preditivos também compreendem: (l) duração da fase lag; (μ) velocidade específica máxima de crescimento (velocidade que a população duplica dentro da fase exponencial) e (A) densidade populacional máxima de crescimento final (maior contagem microbiana, na fase estacionária) (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004). O crescimento microbiano apresenta uma integração de habilidades da microbiologia tradicional com a matemática, estatística e sistemas de informação, sendo que este espectro de habilidades faz com que avanços em qualquer uma destas áreas ofereçam oportunidades para aumentar a utilidade e aplicabilidade dos modelos preditivos (SCHLEI, 2018).

Através das curvas de crescimento geradas pode-se explicar como os microrganismos se proliferam nos alimentos, bem como prever a vida de prateleira deste alimento maximizando este tempo através da modificação das condições de estocagem, indicando assim ao consumidor um prazo de validade suficiente sem promover riscos à saúde (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2014). Pois os microrganismos apresentam diferentes comportamentos microbiológicos e a compreensão desses comportamentos é de extrema importância para a promoção da segurança de alimentos. Diante disso, o campo científico da microbiologia preditiva fornece ferramentas a fim de prevenir e estimar as mudanças promovidas através das operações de manipulação, processamento e armazenamento de alimentos sobre o crescimento, sobrevivência e inativação de microrganismos (USDA, 2016). A

abordagem da modelagem preditiva pode ser explicada por um processo de 3 etapas: modelagem primária, secundária e terciária (ROBAZZA, 2010).

O modelo primário prediz o crescimento bacteriano a partir do tempo como função em condições ambientais constantes, tais como temperatura, pH, Aw e oxigênio. Ao longo do tempo, estes modelos descreveram o tempo entre a inoculação e a multiplicação microbiana, além disso, podem definir as fases de crescimento e inativação, a partir de parâmetros cinéticos como máxima taxa de crescimento, fase lag, taxa de inativação em função do tempo de tratamento (FORSYTHE, 2013; PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013). No caso do modelo secundário, descreve as mudanças realizadas nos parâmetros dos modelos primários com os efeitos das condições ambientais a partir de fatores físico-químicos e biológicos, sendo eles modelos comumente desenvolvidos e utilizados. Já os modelos terciários são normalmente baseados em programas de computador que oferecem uma correlação entre a matemática e o operador, os quais permitem que os dados inseridos de modelos primários e secundários sejam estimados e observados baseados em gráficos, previsões e comparações. Devido um conjunto de regras determinadas no software e dados inseridos, o programa é capaz de formar correlações e fornecer informações para promover tomadas de decisões de um indivíduo (ROBAZZA, 2010).

Diante disso, a microbiologia preditiva permite a investigação e avaliação dos processos de conservação de alimentos, também proporcionam um caminho rápido e benefícios econômicos, pois são aplicados a diversos alimentos reduzindo testes microbiológicos, para obtenção de informações confiáveis sobre crescimento, inativação e sobrevivência durante o desenvolvimento microbiano (McMEEKIN *et al.*, 2002; SARMENTO, 2006). A aquisição de tais informações proporciona a formação de uma base de dados, a qual torna-se uma ferramenta útil para a elaboração de sistemas de informação para monitorar a qualidade do alimento em diversas situações (ROBAZZA, 2010).

Quando estes dados são tratados permite-se que uma equação matemática seja utilizada para prever o tempo de ajuste ao meio e uma

velocidade de crescimento (ANASTÁCIO, 2009). Contudo, o modelo preditivo pode apresentar algumas limitações, como por exemplo, observa-se que os mesmos não podem ser extrapolados para condições nas quais os intervalos de temperatura e atividade de água esteja fora das condições de que foram derivados, entretanto, podem ser replicados para produtos de diversas matrizes alimentares e ambientes semelhantes com base nas multiplicações dos microrganismos aos fatores ambientais que afetam seu crescimento e sobrevivência (FAKRUDDIN *et al.*, 2011). Dentre os modelos preditivos, os mais utilizados em alimentos são os primários de Gompertz ou Gompertz modificado e modelo de Baranyi e Roberts.

3.9. MODELO MATEMÁTICO DE BARANYI E ROBERTS

Os modelos matemáticos têm a finalidade de representar uma curva de crescimento, em uma ou mais fases, utilizando equações que possuem uma parte determinística, representando as variáveis que obtenha um comportamento esperado, e uma parte estocástica, que pode ou não existir no modelo, cujo comportamento é aleatório e desconhecido (DANNENHAUER, 2010).

O modelo de Baranyi e Roberts é considerado primário, os quais são modelos matemáticos que descrevem alterações na população microbiana em função do tempo, sob um conjunto de condições (HUANG, 2014). Estes, também podem ser utilizados para descrever a curva de crescimento e de inativação dos microrganismos, por exemplo (FAKRUDDIN *et al.*, 2011). Neste contexto, apresentam uma estimativa de parâmetros, como a população inicial de crescimento (y_0), a fase de adaptação ou fase lag (λ), a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e a população máxima de crescimento atingida ($y_{\text{máx}}$), os quais podem ser realizados de diferentes formas pelas equações (LONGHI, 2016).

Equações ou funções matemáticas descrevem a mudança das respostas em questão em relação ao tempo, fornecendo desta forma, um grupo característico de valores e parâmetros (FERREIRA, 2004; LONGUI *et al.*, 2014). Sendo assim, por meio deste modelo pode-se obter a taxa de crescimento a população e estimar o tempo de adaptação dos microrganismos,

validando assim um produto probiótico, cujo se faz necessário a atividade e com isso adaptação do mesmo no alimento (JAGANNATH; TSUCHIDO, 2003; SUBRAMANIAM; WAREING, 2016).

O modelo de Baranyi e Roberts é classificado como empírico, cinético e primário, além disso, é amplamente utilizado na microbiologia preditiva. Este modelo propõe prever o crescimento dos microrganismos submetidos a diferentes temperaturas, sendo o mesmo muito utilizado devido algumas razões: fácil de usar; aplicável a condições com variações dinâmicas no ambiente; apresenta uma boa capacidade de ajuste e as maiorias dos parâmetros do modelo são biologicamente interpretáveis (VAN IMPE *et al.*, 2011).

A representação deste modelo está demonstrada na Figura 5.

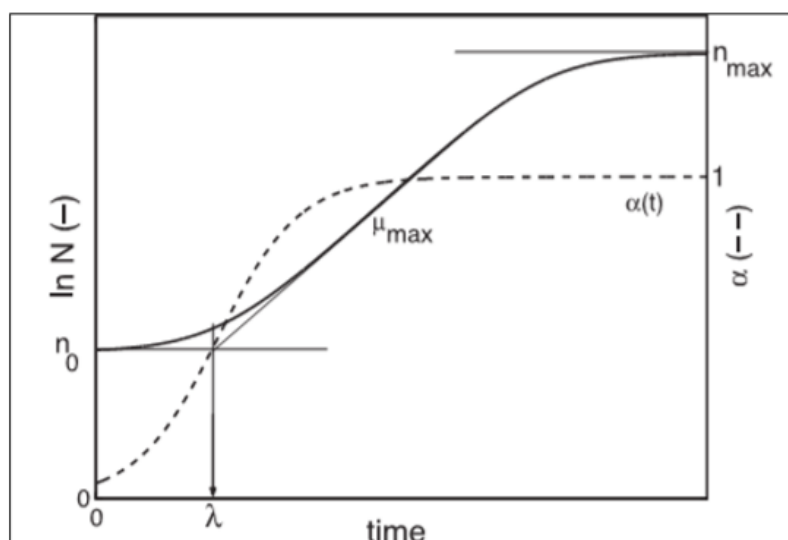


Figura 5 - Simulação do modelo de Baranyi e Roberts (1994)

Fonte: (GIBSON *et al.*, 1994)

Baranyi e Roberts propuseram um modelo que inclui a fase de crescimento exponencial linear (μ_x) e uma fase lag determinada por uma função de ajuste. A função de ajuste deste modelo descreve basicamente os mecanismos biológicos da evolução do crescimento da população dos microrganismos e o estado fisiológico das células dos mesmos ao novo ambiente, a partir da equação 1.

$$\mu_{lag} = \frac{q(t)}{q(t)+1} \quad (1)$$

Sendo $q(t)$ uma função que representa a evolução de uma substância crítica, cuja está relacionada às reações enzimáticas que envolvem os microrganismos. Esta mesma função $q(t)$ é obtida através da equação diferencial 2.

$$\frac{dq(t)}{dt} = vq(t) \quad (2)$$

Onde a velocidade específica da substância crítica v , pode ser considerada igual à velocidade específica máxima de crescimento da cultura ($\mu_{m\acute{a}x}$), no qual a razão é a característica do ambiente atual.

A função de inibição $v(t)$ pertence à família de curvas de Richards (1959), mostrada na equação 3, tendo em vista que não há mecanismo biológico envolvido.

$$\mu_{est} = 1 - \left[\frac{N(t)}{N_{m\acute{a}x}} \right]^m \quad (3)$$

Tendo m como um parâmetro da curvatura e $N_{m\acute{a}x}$ a população microbiana máxima.

Quando consideramos as equações para μ_{lag} e μ_{est} , e as condições ambientais, pode-se então construir a equação 4.

$$\frac{dD(t)}{dt} = \left[\frac{q_0}{q_0 + \exp(-\mu_{m\acute{a}x}t)} \right] \mu_{m\acute{a}x} \left[1 - \left[\frac{N(t)}{N_{m\acute{a}x}} \right]^m \right] N(t) \quad (4)$$

Esta tem solução explícita, apresentada na equação 5.

$$D(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x} A(t) - \left[\frac{1}{m} \right] \ln \left(1 + \frac{\exp(m\mu_{m\acute{a}x} F(t)) - 1}{\exp(m[y_{m\acute{a}x} - y_0])} \right) \quad (5)$$

Onde $D(t)$ é o diâmetro da colônia e a função $A(t)$ é dada pela equação 6 a seguir, a qual descreve o mecanismo biológico envolvido na evolução do estado fisiológico das células..

$$A(t) = t + \left[\frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \right] \ln \left(\frac{q_0 + \exp(-\mu_{m\acute{a}x}t)}{1 + q_0} \right) \quad (6)$$

Sendo q_0 , o estado fisiológico inicial da célula. Entretanto, o parâmetro m não melhora significativamente em relação à qualidade dos ajustes em alguns casos, por este motivo pode-se considerá-lo como sendo igual a um (LONGHI, 2016).

Para que haja melhor ajuste do modelo aos dados experimentais, os autores do mesmo recomendam a transformação do parâmetro q_0 em h_0 por meio da equação 7, com a finalidade de deixar o ajuste da equação mais estável.

$$h_0 = \ln\left(\frac{1}{q_0}\right) \quad (7)$$

Sendo assim, a equação 6 pode ser transformada na equação 8.

$$A(t) = t + \left[\frac{1}{\mu_{máx}}\right] \ln(\exp(-\mu_{máx}t) + \exp(-h_0) - \exp(-\mu_{máx} - h_0)) \quad (8)$$

Por fim, a duração da fase lag (λ) pode ser obtida pela equação 9.

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{máx}} \quad (9)$$

O fato deste modelo considerar em sua equação o estado fisiológico inicial das células, torna-se o mesmo importante para ser utilizado em alimento. Caso a adaptação do microrganismo ao ambiente que se encontra for lenta, a fase lag será estendida, com isso, assim que as células se adaptarem ao novo ambiente, elas crescerão de forma exponencial até atingir a fase estacionária, que será alcançada quando houver restrições no meio de crescimento (BARANYI; ROBERTS, 1994).

Diante do exposto, o modelo de Baranyi e Roberts, apresenta uma elevada popularidade principalmente em matrizes alimentares, a qual deve ser atribuída à sua flexibilidade e facilidade de utilização devido ao desenvolvimento de softwares que colaboram com os cálculos do mesmo, como MicroFit, DMFit e macro do software Microsoft Office Excel.

3.10. MODELO MATEMÁTICO DE GOMPERTZ

O modelo de Gompertz e o modelo de Baranyi e Roberts são comumente citados na literatura como as principais equações que se ajustam ao crescimento em nível primário (ARROYO-LÓPEZ *et al.*, 2012).

O modelo de Gompertz é um modelo primário não-linear e isotérmico, ou seja, as temperaturas são constantes, sendo uma função exponencial dupla, que descreve uma curva sigmoide assimétrica. A ideia do modelo é representar a limitação de espaço e/ou nutrientes, com uma curva sigmoide produzida com quatro fases comparáveis às curvas de crescimento microbiológico: lag, aceleração, desaceleração e estacionária, bem como a produção de metabólitos tóxicos, com 40 velocidades de crescimento evoluindo até um máximo e não diminuindo depois também se assemelhando as fases do crescimento microbiano (ZHOU *et al.*, 2012; FORSYTHE, 2013).

Este tem sido utilizado comumente para descrever o comportamento microbiano em diferentes alimentos, com matrizes cárneas, lácteas e de vegetais. Além disso, utiliza uma taxa de inibição da variável de estado proporcional ao logaritmo desta mesma variável. O que significa que a taxa de crescimento é grande no início do processo, mudando rapidamente para um crescimento mais lento, o que se torna bastante adequado em casos de crescimentos celulares, como plantas, bactérias e tumores (BASSANEZZI, 2011).

A utilização tem sido um sucesso para descrever o comportamento microbiano em diversos alimentos. Este modelo sofreu uma nova parametrização da função de Gompertz, a qual foi proposta para que fosse possível a inclusão dos parâmetros biológicos na equação e a não necessidade de equações auxiliares para definir determinados parâmetros, podendo ser representados por: velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$), tempo de duração da fase lag (λ) e o aumento logarítmico da população (A), surgindo assim o modelo de Gompertz modificado (ZWIETERING *et al.*, 1990). Este apresenta os parâmetros microbiológicos incluídos na equação, porém há mais estabilidade numérica da otimização destes parâmetros quando utilizados o modelo tradicional de Gompertz.

. Os parâmetros inclusos de crescimento microbiano podem ser aplicáveis aos probióticos, sendo úteis para identificar as etapas da curva de crescimento (fase lag, exponencial e estacionária), e conseqüentemente as principais condições cujo crescimento é mais adequado para garantir quantidade suficiente de microrganismos para obtenção do efeito probiótico durante o prazo de validade do produto. O modelo de Gompertz modificado promove ajuste aos dados experimentais para bactérias ácido lácticas nos alimentos, por isso sua utilização vem crescendo ao longo dos anos (SLONGO *et al.*, 2009; GEITENES *et al.* 2013; KALSCHNE *et al.* 2014).

O modelo de Gompertz foi inicialmente utilizado para descrever o crescimento microbiano conforme a equação 10.

$$y(t) = a + c \exp(-\exp(-b[t - d])) \quad (10)$$

Sendo:

$y(t)$ = logaritmo da contagem microbiana no tempo t ;

E a , b , c e d = parâmetro empíricos do modelo.

Estes parâmetros estão relacionados com os parâmetros microbiológicos de crescimento λ (duração da fase lag), $\mu_{m\acute{a}x}$ (velocidade específica máxima de crescimento) e A (aumento logarítmico da população) pelas seguintes equações:

$$\lambda = d \cdot \frac{1}{b} \quad (11)$$

$$\mu = \frac{b \cdot a}{\exp} \quad (12)$$

Onde:

μ = velocidade específica máxima de crescimento;

λ = Duração da fase lag;

$\exp = e = 2,7182$

Com a nova parametrização do modelo, foi proposta a substituição dos parâmetros empíricos pelos parâmetros de significado biológico, o que se resultou no modelo modificado segundo a equação 13.

$$Y(t) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\exp(1)\mu_{m\acute{a}x}}{A} [\lambda - t] + 1\right)\right) \quad (13)$$

Sendo:

$$Y(t) = \log \frac{N}{N_0} \quad (14)$$

$Y(t)$ = razão logarítmica entre a contagem microbiana no tempo e a contagem inicial;

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade específica máxima de crescimento;

λ = duração da fase lag;

A = amplitude da curva sigmoidal.

A representação do modelo de Gompertz modificado pode ser observada na Figura 6.

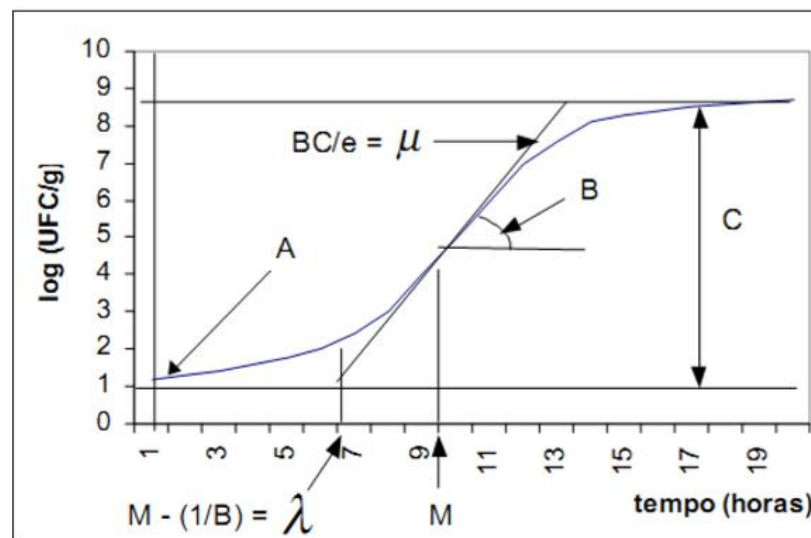


Figura 6 - Parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada

Fonte: (ZWIETERING *et al.*, 1990)

Tanto o Modelo de Gompertz original quanto o modificado, têm sido testados em variedade de espécies de microrganismos e apresentado bons

ajustes. Entretanto, o ajuste do Modelo de Gompertz é afetado pelo número de observações utilizado na construção da curva para um bom ajuste da função. Desta forma, torna-se possível caracterizar um problema se o crescimento é muito rápido, se a duração da fase lag é muito curta ou se o experimento termina antes que se atinja a fase estacionária (AZEVEDO *et al.*, 2020). (LABUZA; FU, 1993).

3.11. VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

A validação permite ao pesquisador testar a eficácia do modelo utilizado na predição do comportamento do probiótico no alimento. A validação é uma etapa fundamental na modelagem matemática de processos de fenômenos físicos, químicos e biológicos, para que seja possível a aplicação dos modelos, avaliando desta forma a eficiência. Quando há aplicação técnica estatística adequada, pode-se avaliar a capacidade de predição do modelo que será validado e futuramente utilizado a partir do comportamento de microrganismos patogênicos ou probióticos em alimentos, bem como a qualidade e confiabilidade dos mesmos (JUNEJA *et al.*, 2014). Por este motivo que os índices estatísticos são tão utilizados para avaliar e comparar estes modelos.

A validação pode ser realizada de duas formas, a primeira quando ocorre nas mesmas condições do experimento que foram retirados os dados para elaborar o modelo matemático, neste caso, a mesma denomina-se validação interna e objetiva determinar se o modelo é capaz de descrever os dados do experimento. A segunda quando a comparação é feita entre predições e dados independentes que foram retirados de outros Testes de Desafios ou dados da literatura, conhecida como validação externa (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

Uma das principais e mais utilizadas formas de avaliar o modelo escolhido é através da validação interna, utilizando a comparação entre os valores preditos no modelo e os valores obtidos experimentalmente (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013). Para a validação, faz-se necessário a avaliação que deverá ser realizada a partir dos seguintes índices: erro médio

quadrático (MSE), fator bias, fator de exatidão e coeficiente de determinação (R^2) (ROSS, 1996).

O coeficiente de determinação ou regressão, R^2 , é usado como uma média global da predição obtida, medindo a fração de variação explicada pelo modelo, cujo seu valor pode variar entre 0 e 1, sendo quanto mais próximo de 1, melhor a predição do modelo. O MSE é um índice que avalia o desvio médio existente entre os modelos preditos e obtidos experimentalmente, quanto menor o valor de MSE, melhor o ajuste do modelo nos valores experimentais (NUNES et al., 2021).

O MSE fornece um comparativo para o erro entre diferentes modelos considerando a soma dos quadrados residuais e o grau de liberdade, conforme descrito na equação 15.

$$MSE = \frac{RSS}{n^*} = \frac{(valor_{observado} - valor_{predito})^2}{n-p} \quad (15)$$

Onde RSS = soma dos quadrados residuais

n^* = número de grau de liberdade ($n - p$ = número de pontos experimentais – número de parâmetros do modelo).

RMSE é o erro quadrático médio da raiz, calculado a partir da equação 16 a seguir.

$$RMSE = \left[\frac{1}{num-var} \right] \sqrt{\sum_{var}^{num} (pd_i - ob_i)^2} \quad (16)$$

Dois índices são propostos para avaliar o desempenho dos modelos: fator bias e o fator de exatidão. Estes permitem uma maior confiabilidade e ajudam no processo de validação dos mesmos (CHOWDHURY et al., 2007; ZHOU et al., 2008; SAUCEDO-REYES et al., 2009; ZIMMERMANN et al., 2011).

O fator bias demonstra a estimativa da diferença entre os valores preditos e observados. O mesmo é um desvio relativo médio, fornecendo informação sobre o tipo de desvio, pois procura dar o mesmo peso na média

dos valores que sobre-estimam e subestimam a média. Entretanto, quando o fator bias é igual a 1 indica um acordo perfeito entre os valores preditos e observado. Para curvas de crescimento microbiano, um fator bias menor que 1, significa um valor predito acima do observado, ou seja, uma falha de forma segura, e um fator bias maior que 1, o valor predito está abaixo do observado, indicando assim uma falha perigosa (TREMARIN, 2013). Este valor é medido através da equação 17.

$$fator\ bias = 10 \left(\sum \frac{\log\left(\frac{valor\ observado}{valor\ predito}\right)}{n^*} \right) \quad (17)$$

O fator de exatidão expressa uma medida para obter a diferença absoluta entre os valores preditos e observados. Conforme o fator aumenta, menos exato na média se torna, tendo que os valores positivos e negativos tendem a se anular. Por se tratarem de valores absolutos, o cálculo é sempre maior que 1 (SARMENTO *et al.*, 2013). Este valor é obtido a partir da equação 18.

$$fator\ exatidão = 10 \left(\sum \frac{|\log\left(\frac{valor\ observado}{valor\ predito}\right)|}{n^*} \right) \quad (18)$$

Onde n^* = número de grau de liberdade.

Este índice não indica o sentido do desvio do modelo. Quando ambos os fatores, bias e de exatidão, apresentam valor igual 1, demonstra uma perfeita concordância entre os valores preditos e observados (TREMARIN, 2013).

O coeficiente de determinação ou regressão corresponde à proporção da variação explicada pela equação de regressão em relação à variação total das respostas. O valor obtido torna-se melhor ajustado quanto mais próximo de 1. Este coeficiente é encontrado pela equação 19.

$$R^2 = \frac{SQRL}{SQT_c} \quad (19)$$

Sendo que:

SQT_c = soma quadrática total corrigida;

$SQRL$ = soma quadrática de regressão linear.

Para que o R^2 seja ajustado, deve-se basear no coeficiente de correlação de Pearson elevado ao quadrado, número de pontos experimentais e variáveis significativas, calculando conforme a equação 20.

$$R_{aj}^2 = \left[\frac{num-1}{num-var+1} \right] \left[1 - \frac{[\sum([pd_i - pd] [ob_i - ob])]^2}{\sum(pd_i - pd)^2 \sum(ob_i - ob)^2} \right] \quad (20)$$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado de acordo com as seguintes etapas: preparação do salame de ovino, análise físico-química, análise microbiológica, análise de conservação durante a vida de prateleira e avaliação do crescimento microbiano através da aplicação de duas modelagens matemáticas com o auxílio de um Software computacional. As etapas foram realizadas no Laboratório de Tecnologia de Origem Animal (Carnes) do Departamento de Engenharia Química (DEQ) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.1. PREPARO DO MATERIAL

Foram executados todos os procedimentos de higiene, assepsia e preparos recomendados das vidrarias e recipientes; e do ambiente do laboratório, seguindo os procedimentos de Boas práticas de Laboratório (BPL), e Boas Práticas de fabricação (BPF), de modo que pudessem garantir e atender aos padrões de identidade e qualidade do alimento ao final do processo.

Os meios de cultura utilizados no presente trabalho foram preparados a partir das instruções fornecidas pelo fabricante, garantindo meios estéreis em todas as etapas a fim de evitar contaminações.

4.1.1. Obtenção da carne de cordeiro e toucinho

As amostras de pernil de carne de cordeiro foram adquiridas em comércio local da cidade Recife - PE. As amostras de toucinho foram fornecidas pela empresa Frigomalta da cidade de Igarassu – PE.

4.1.2. Obtenção das amostras Bacterianas de Referência

As cepas das culturas iniciadoras e dos probióticos *Lactobacillus casei* e *paracasei* utilizadas foram adquiridas da empresa COANA PROBIOTICAL cepa probiótica liofilizada *L. casei* (LC03) e *L. paracasei* (LPC00) na concentração de 10^{11} UFC/mL.

4.1.3. Ativação dos Inóculos

Anteriormente à inoculação no embutido fermentado tipo salame, realizou-se lentamente o descongelamento das cepas pelo processo “overnight” em geladeira à temperatura entre 8°C e 4°C. Em seguida, as cepas puras liofilizadas de *L. casei* e *L. paracasei*, foram pesadas 0,300g de cada e inoculadas em 300 mL de caldo MRS cada cepa, a fim de pré-ativa-lás. As mesmas foram incubadas por aproximadamente 24 horas em estufa Incubadora B.O.D. a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após a pré-ativação dos *Lactobacillus*, introduziu-se o caldo MRS de cada cepa em tubo Falcon e então procedeu-se a centrifugação refrigerada para ambas as culturas ativada a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ em 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado adicionado à massa dos embutidos após a adição de todos os demais ingredientes e da cultura starter, a qual também necessitou de ativação em água adicionada de sacarose por 30 minutos. Paralelo à produção do embutido, retirou-se do volume total do precipitado de cada cultura 1mL para a contagem do número de células viáveis dos inóculos em placas de petri com ágar MRS, incubando-se por aproximadamente 48 horas em estufa Incubadora B.O.D. à $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

A concentração celular de *L. casei* obtida após centrifugação e adicionada a Formulação 2 foi estimada de $7,5 \times 10^7$ UFC. mL^{-1} de inóculo; e para *L. paracasei* na Formulação 3 de $7,5 \times 10^7$ UFC. mL^{-1} de inóculo.

4.2. PRODUÇÃO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME

Foram elaboradas três formulações de embutido fermentado de ovino, os quais serão caracterizados como S1, S2 e S3, sendo eles: embutido fermentado de ovino com sais de cura, embutido fermentado de ovino com adição de *Lactobacillus casei* e embutido fermentado de ovino com adição de *Lactobacillus paracasei*, respectivamente. O primeiro refere-se ao produto padrão usado como referência para os resultados, apresentando sais de cura para manter o prazo de vida útil, já o segundo e o terceiro, se referem aos produtos de estudo, a fim de compreender a cepa probiótica irá apresentar a curva de crescimento com células viáveis ao longo do processo produtivo até o produto final, bem como qual se manterá até o encerramento da vida de

prateleira de 84 dias do embutido sem crescimento de microrganismos patógenos.

Inicialmente ao processo de fabricação, realizou-se toda a etapa de higienização dos materiais e ambientes utilizados para produzir o embutido, seguindo-se para isto as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Todos os colaboradores do processo de produção fizeram uso de todos os Equipamentos de Proteção Individual (EPI) de forma adequada, dentre eles: luvas; touca; máscara; sapato fechado e jaleco, garantindo desta forma a biossegurança. Com intuito de assegurar as características higiênico-sanitárias do produto final foram adotados protocolos de controle de qualidade de matéria-prima e processos.

As formulações dos embutidos fermentados produzidos estão descritas na Tabela 1, estando representadas, para cada ensaio, as cepas de *Lactobacillus* utilizadas.

Tabela 1 - Composição das formulações de embutidos fermentados com inoculação de *Lactobacillus*.

| Ingredientes | Quantidades (%) | | |
|--------------------------------|-----------------|-----------|-----------|
| | Ensaio S1 | Ensaio S2 | Ensaio S3 |
| Pernil de cordeiro | 77,50 | 77,50 | 77,50 |
| Toucinho | 20,00 | 20,00 | 20,00 |
| Sais de cura | 0,25 | - | - |
| Sacarose | 0,50 | 0,70 | 0,70 |
| Pimenta | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| Alho | 0,13 | 0,13 | 0,13 |
| Antioxidante | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Cloreto de sódio | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| Cultura Starter | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | - | 0,05 | - |
| <i>Lactobacillus paracasei</i> | - | - | 0,05 |

Fonte: Autor, 2022

Os embutidos foram pesados em uma balança analítica (BEL ENGINEERING) seguindo as proporções da Tabela 1. O pernil de cordeiro foi cortado e moído em um *cutter* (Becker modelo MBI-98P) por 15 minutos até que a massa cárnea se tornasse homogênea, adicionando o toucinho para que fosse possível obter uma massa homogênea e emulsionada. Em seguida, foram adicionados os demais ingredientes, sendo por último a adição das cepas probióticas *Lactobacillus casei* para o ensaio S2 e *Lactobacillus paracasei* para o ensaio S3 (COANA) homogeneizando-os por aproximadamente 2 minutos de forma manual até a obtenção de uma emulsão cárnea homogênea. Os salames foram embutidos com o auxílio de uma embutidora mecânica (CAF Máquinas) em tripas celulósicas, amarradas manualmente e levadas à estufa de fermentação e maturação B.O.D. com umidade e temperatura controlada de forma diferente de acordo com o tempo de maturação até completar 30 dias, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições operacionais de processo de fermentação e maturação de embutidos fermentados cárneos.

| Tempo (Dias) | Temperatura °C | Umidade Relativa do ar (%) |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| <i>Fermentação</i> | | |
| 1 | 25 | 89 |
| 2 | 24 | 89 |
| 3 | 23 | 88 |
| 4 | 22 | 88 |
| 5 | 21 | 87 |
| 6 | 20 | 86 |
| 7 | 18 | 80 |
| <i>Maturação</i> | | |
| 8-30 | 15 | 75 |
| <i>Armazenamento</i> | | |
| 31-90 | 4 | Não controlada |

Fonte: MACEDO, 2008

Após o processo de maturação, os embutidos fermentados foram submetidos a um armazenamento em câmara fria entre 7 e 4°C, sendo avaliados durante o prazo de validade de 84 dias a cada 14 dias, realizando as análises microbiológicas estabelecidas pela legislação e avaliando o crescimento dos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, bem como realizando análises físico-químicas no tempo 0 após a maturação a contar da vida útil do produto.

O processamento do embutido fermentado tipo salame seguiu o fluxograma da Figura 7 a seguir.

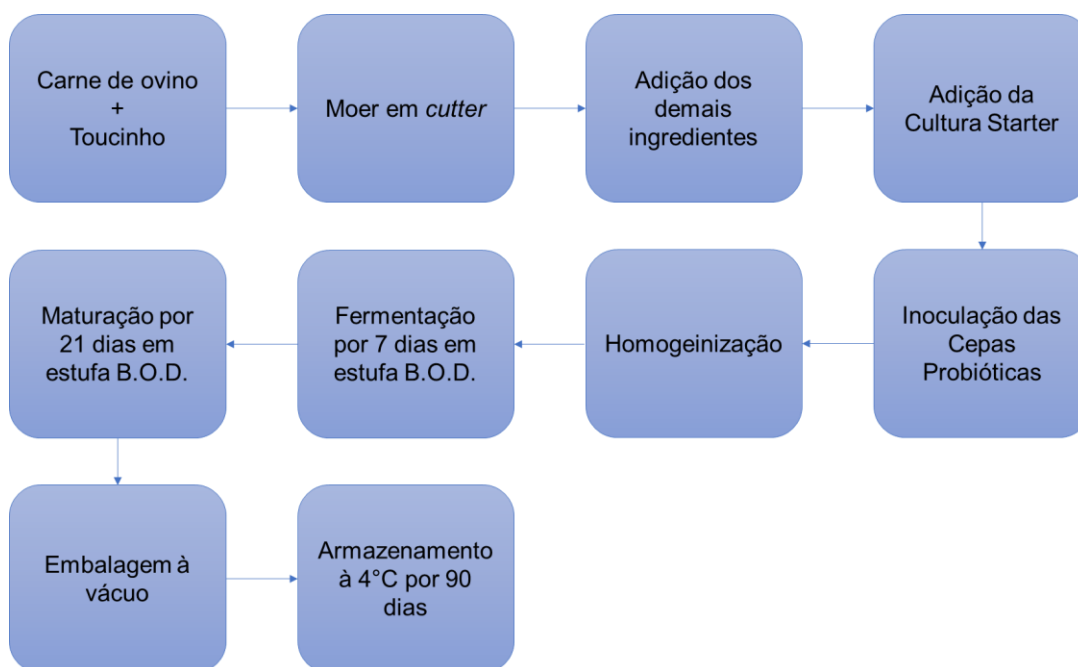


Figura 7 - Fluxograma do processamento do embutido fermentado tipo salame de carne de ovino.

Fonte: Autor, 2022

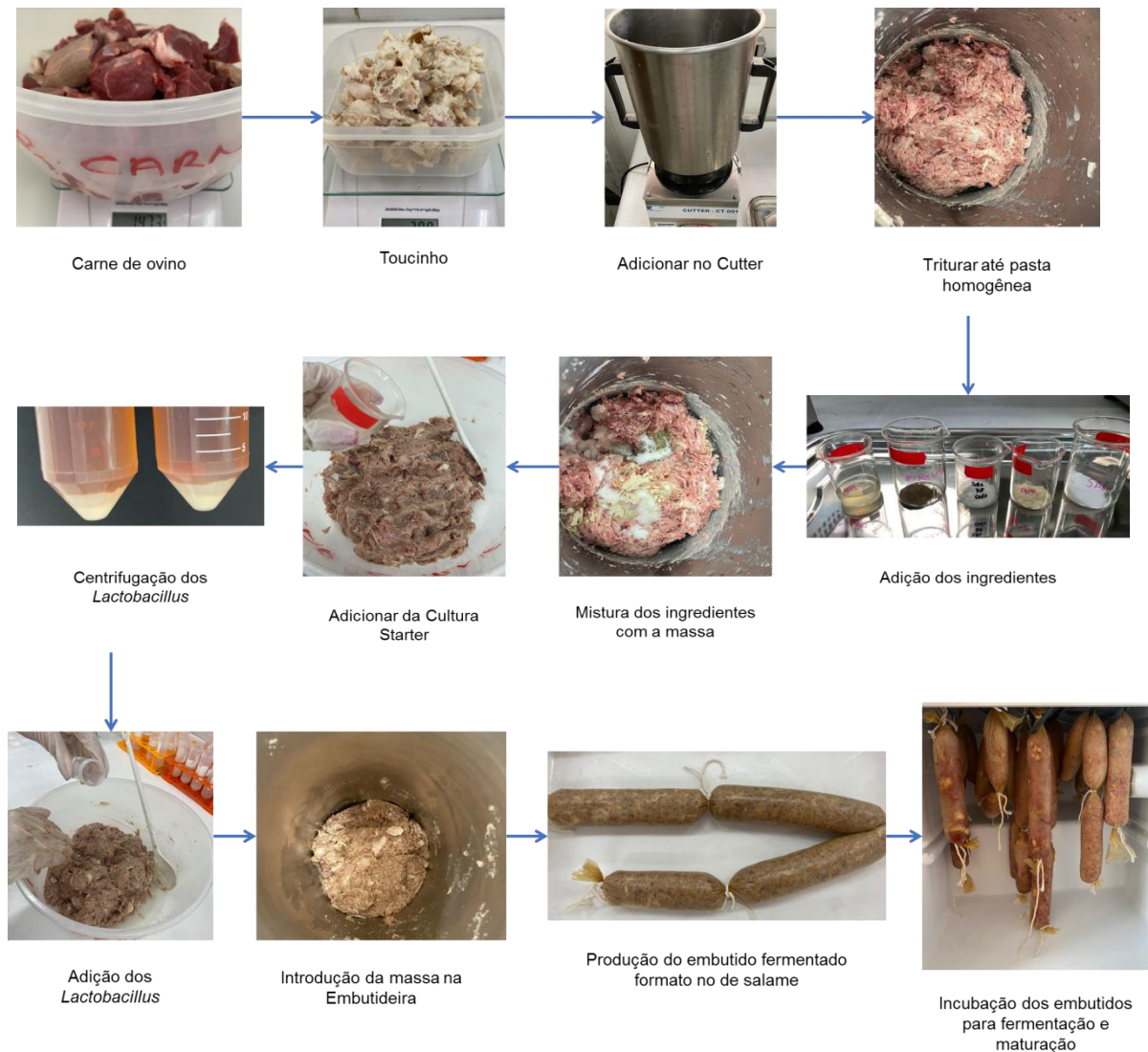


Figura 8 - Etapas do processamento do embutido fermentado tipo salame de carne de ovino probiótico.

Fonte: Autor, 2022.

4.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS E SUAS DILUIÇÕES

Foram pesadas aproximadamente 25g de cada uma das amostras de embutido, transferidas assepticamente para frascos adicionados de 225mL de solução salina peptonada estéril preparada a 0,85% de NaCl e 1% de peptona microbiológica, obtendo diluição de 10^{-1} de diluição inicial. A partir da mesma foram preparadas as diluições seriadas posteriores até 10^{-10} .

4.4. CONTAGEM DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

O controle do crescimento dos probióticos *Lactobacillus paracasai* e *Lactobacillus casei*, foi realizado a partir da contagem total em placas de petri das bactérias ácido-lácticas viáveis por meio da técnica de plaqueamento em profundidade (*Pour plate*) e sobrecamada em meio ágar MRS (suplementado com 2% de glicose p/v) a partir de alíquotas de 1mL de cada uma das 10 diluições de soluções salinas preparadas. Após a solidificação do meio em temperatura de 18°C, as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose na estufa a 36°C ± 1°C por 72 horas e as colônias foram expressas em UFC/mL ou UFC/g.

Para analisar o crescimento dos probióticos, a contagem das bactérias foi realizada em um intervalo de 14 dias, num período total de 84 dias para os ensaios S2 e S3 que continham probióticos na formulação.

4.5. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas realizadas foram: pH, acidez titulável, umidade, lipídeos, proteínas, cinzas, carboidrato, valor calórico, atividade de água, e análises físicas: texturômetro e colorimetria. Todas as análises seguiram os métodos analíticos oficiais para controle de produto de origem animal segundo a Instrução Normativa nº68 (BRASIL, 2006). As mesmas foram realizadas após a produção do embutido fermentado tipo salame, inoculação dos probióticos, fermentação e período de maturação do mesmo, sendo algumas análises realizadas no tempo 0 após maturação e outras no tempo 84, no fim do prazo de validade

4.5.1. pH

Para a determinação do pH, foi transferido 10,000g ± 0,001g das três amostras de embutido fermentado de carne de ovino para um béquer de 100mL que será agitado com um bastão de vidro para melhor homogeneização. Em seguida foi realizada a devida calibração do equipamento pHmetro com soluções tampão de pH 4 e 7, após este procedimento iniciou-se a medida do pH da amostra em triplicata nas três formulações. As análises de pH foram realizadas nas primeiras horas após a produção do embutido fermentado, afim de identificar se o pH estava ideal para

o crescimento das culturas Starters e probióticas, e a partir disso, a aferição passou-se a ser feita a cada 15 dias durante 84 dias (BRASIL, 2006).

4.5.2. Acidez Titulável

Foi utilizado para esta determinação o método que consiste em transferir 5,000g \pm 0,001g da amostra do salame macerado para um béquer de 100 mL, homogeneizando com bastão de vidro por 5 minutos. Em seguida as amostras foram filtradas transferidas para um balão volumétrico de 100 mL adicionando 5 gotas de fenolftaleína a 1% que foi titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1N até a obtenção de coloração rósea persistente. Este procedimento foi realizado em triplicata tanto logo após as etapas de fermentação e maturação do embutido fermentado tipo salame, quanto em seguida, após 84 dias de vida de prateleira do produto (BRASIL, 2006).

O teor de acidez foi calculado utilizando-se a equação 21.

$$Acidez (mM) = \frac{VxNxfxPM}{m} * 100 \quad (21)$$

V = Volume gasto da base

N = Normalidade da Base (0,1N)

F = Fator de correção

PM = Peso molecular do ácido láctico

M = Peso da amostra

4.5.3. Lipídeos

Para determinação de lipídeos no embutido, fez-se necessário a utilização do método de Bligh-Dyer (1959), que é um processo de determinação de lipídeos a frio.

De início, pesou-se aproximadamente 3 g da amostra, homogeneizou-se a mesma e transferiu-se para um béquer. Adicionou-se 50mL de clorofórmio e 100mL de metanol. Após um pequeno intervalo de tempo adicionou-se novamente 50mL de clorofórmio e 50mL de água. A solução foi agitada, com o

auxílio de um agitador mecânico, por um período de 15 minutos. O material homogeneizado foi filtrado utilizando um funil de vidro com papel filtro. Após completa separação e clarificação, foi recolhida a camada de clorofórmio com o auxílio de uma pipeta. Levou-se a solução para uma chapa aquecedora dentro de uma capela química e esperou-se até que houvesse a evaporação completa do solvente. Aguardou-se então o resfriamento até temperatura ambiente em dessecador e pesou-se o volume que restou. Por fim, foi necessário repetir a operação até peso constante.

O teor de gordura foi calculado utilizando-se a equação 22.

$$\text{Lipídeos (\%)} = \frac{PB-PBS}{PA} * 100 \quad (22)$$

PB = Peso do becker vazio

PBS = Peso do becker seco

PA = Peso da amostra

4.5.4. Umidade

Inicialmente foi colocada a capsula em estufa a $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ aproximadamente durante 4 horas. Esperou-se que esfriasse em dessecador e pesou-se para o cálculo final. Posteriormente, foram pesados $5,000\text{g} \pm 0,001\text{g}$ das amostras previamente preparadas, cuja foram levadas a estufa a 105°C aproximadamente durante 4 horas, esperou-se esfriar em dessecador e pesou-se também para cálculo final. A operação foi repetida até uma massa constante ser alcançada (IAL, 1985). Este procedimento foi realizado em triplicata.

Cálculo para determinação de Umidade (%) de acordo com a equação 23.

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{100xN}{P} \quad (23)$$

N = n° em gramas de umidade (perda da amostra)

P = n° em gramas de amostra

4.5.5. Atividade de água

A atividade de água foi determinada utilizando-se um medidor específico para atividade de água modelo AquaLab CX2 (Decagon Devices Inc.®, Pullman, Estados Unidos). Os três ensaios dos salames foram fatiados e triturados para serem dispostos em recipientes próprios para a análise, o qual o mesmo foi introduzido dentro do equipamento em triplicata para cada ensaio. Após o equipamento atingir o equilíbrio, foi dado o valor da atividade de água de forma automática.

O aparelho foi previamente calibrado com água destilada, que possui atividade de água de 0,99, à temperatura ambiente (20 a 25°C) (BRASIL, 1999). A determinação da atividade de água foi feita logo após a elaboração do salame, após o processo de maturação e, ao final da vida de prateleira, nos tempos 0 e 84 dias de armazenamento. Foi analisada uma peça de cada tratamento, escolhida aleatoriamente em cada tempo de análise para cada repetição da triplicata.

4.5.6. Cinzas

Primeiramente necessitou-se colocar o cadinho em mufla a 500°C aproximadamente durante 4 horas. Esperou-se em dessecador o resfriamento e pesou-se para cálculo final. Em seguida, pesou-se 5,000g ± 0,001g da amostra previamente preparada e foi levada a mufla a 500°C aproximadamente durante cerca de 6 horas, quando a amostra apresentou aparência esbranquiçada, esperou-se então esfriar em dessecador e pesou a amostra. A operação foi repetida até massa constante (IAL, 1985). Este procedimento foi realizado em triplicata.

Cálculo para determinação de Cinzas (%) de acordo com a equação 24.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{100 \times N}{P} \quad (24)$$

N = n° em gramas de cinzas

P = n° em gramas de amostra

4.5.7. Proteínas

O percentual de proteína foi obtido a partir do conteúdo de nitrogênio total da amostra, utilizando-se o método de Kjeldahl.

A princípio realizou-se a primeira etapa, a digestão, na qual pesou-se $1,000\text{g} \pm 0,001\text{g}$ de mistura catalítica digestora (K_2SO_4 e CuSO_4), $1,000\text{g} \pm 0,001\text{g}$ da amostra no tudo de Kjeldahl e adicionou-se por fim 7mL de ácido sulfúrico. Em seguida, foi aquecido lentamente o mesmo em bloco digestor, mantendo uma temperatura de aproximadamente $50 \pm 1^\circ\text{C}$ por uma hora, elevando gradativamente a temperatura até atingir cerca de $400 \pm 1^\circ\text{C}$. Ao apresentar um líquido límpido e transparente, a amostra foi retirada do aquecimento e adicionada 100mL de água destilada a mesma.

Posteriormente, a segunda etapa foi realizada, a destilação, cuja acoplou-se ao destilador o tubo de Kjeldahl com a amostra digerida, um Erlenmeyer contendo 20mL de solução de ácido bórico a 4% (m/v) com 5 gotas de indicador misto. Adicionou-se então hidróxido de sódio a 50% (m/v) ao destilador até que o conteúdo do tubo se tornasse escuro. Por fim, durante o processo de destilação, coletou-se 100mL em um béquer do destilado.

Por fim prosseguiu-se então para a terceira etapa, a titulação, onde titulou-se com uma solução de ácido clorídrico 0,1N os 100mL de material coletado, até que percebesse o ponto de viragem. Anotou-se o volume gasto neste processo e foi realizado os cálculos necessários (IAL, 1985).

Este procedimento foi realizado em triplicata.

Cálculo para a determinação de Proteína (%) de acordo com a equação 25.

$$Proteína (\%) = \frac{0,14xfxV}{P} \quad (25)$$

Sendo:

V = volume de ácido clorídrico gasto na titulação

P = n^o de grama da amostra

f = fator de conversão

4.5.8. Carboidrato e valor calórico

Os carboidratos foram obtidos por diferença, através do somatório das determinações de umidade, proteína, lipídeos, fibras e cinzas, subtraídas de 100, realizados em triplicada para as três amostras (AOAC, 2005). O valor calórico foi calculado pela equação 26.

$$\text{Valor calórico } \left(\frac{\text{kcal}}{\text{g}}\right) = \text{proteína} * 4 + \text{lipídeos} * 9 + \text{carboidratos} * 4 \quad (26)$$

4.5.9. Determinação de cor

As três amostras submetidas a diferentes tratamentos e formulações, foram cortadas e as análises foram realizadas em triplicata, após o período de maturação no tempo 0 de armazenamento. A cor das amostras foi avaliada utilizando um colorímetro Konica Minolta, modelo CM700d/600d (sistema CIE L* a* b*), cujo sistema considera as coordenadas L* luminosidade (preto/branco), a* teor de vermelho (verde/vermelho) e b* teor de amarelo-azul/amarelo (ABULARACH.; ROCHA; FELÍCIO, 1998). As leituras foram feitas para as três amostras do embutido fermentado para cada tratamento e assim determinar os parâmetros de cor. A análise dos resultados foi submetida ao teste de comparação de médias pelo método de Tukey (p<0,05), utilizando ANOVA.

4.5.10. Análise de textura

Para a análise de textura os embutidos foram cortados em cilindro de 4 cm, comprimidos com dois ciclos de compressão, utilizando-se texturômetro TA. A velocidade do teste de 1,5mm/s e para o pré e pós teste 10mm/s, os quais foram analisados os parâmetros de dureza (N), adesividade (N.s), resistência (%), coesividade, elasticidade (%), gomosidade e mastigabilidade. Para a Força de Cisalhamento foi utilizada a lâmina Warner Bratzler (HDP/BSW) para realizar a avaliação (BOURNE, 1978). Essa avaliação foi realizada em triplicata, após as etapas de fermentação e maturação para que o embutido obtenha textura adequada para iniciar a análise, no tempo 0 de armazenamento.

4.6. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

As formulações dos embutidos fermentados de carne ovina desenvolvidos foram submetidas às análises microbiológicas sendo pesquisados os seguintes microrganismos de acordo com a Resolução RDC nº 60, de 23 de dezembro de 2019, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2019), seguindo a metodologia descrita na American Public Health Association – APHA, que oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal: *Staphylococcus aureus*; *Salmonella sp*; *Clostridium Perfringens* e *Escherichia coli* (APHA, 2005).

4.6.1. Salmonella

A análise de Salmonella foi feita segundo metodologia recomendada pela APHA. No pré-enriquecimento, um volume de 25 mL das amostras foi adicionado a 225 mL de caldo lactosado. Esses homogenatos foram incubados a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Desses caldos de pré-enriquecimento foram transferidas duas alíquotas de 1 mL para tubos contendo 10mL dos caldos Selenito Cistina e Rappaport, seguindo-se pela incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A partir dos tubos inoculados de caldo Selenito Cistina e caldo Rappaport, foram feitas estrias compostas, com auxílio de uma alça de platina, em placas contendo ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e Bismulto Sulfito. As placas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24 horas, para isolamento de colônias típicas de *Salmonella spp*.

4.6.2. Clostridium perfringens

Inicialmente foi necessário realizar diluições seriadas da amostra, tomando 25 mL da amostra para 225mL de solução diluente em frasco de vidro com tampa de rosca, semando a alíquota de 0,1mL (100µL) da amostra em superfície do PERFRINGENS AGAR BASE (TSC/SFP) solidificado, espalhando com alça de Drigalski estéril e após aproximadamente 5 minutos, distribuiu-se sobrecamada do Agar, aguardando a solidificação do meio, e então incubou-se as placas, sem inverter, em jarra de anaerobiose à temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h-48h.

Posteriormente, selecionou-se placas com contagem entre 20-200 colônias típicas para *Clostridium* sulfito redutor (negras, com tamanho variável), contou-se e registrou-se o resultado para realizar o cálculo do resultado considerando a alíquota semeada 0,1mL. O resultado presuntivo corresponde ao número de *Clostridium* sulfito redutor presente por grama da amostra e é expresso como UFC/g da amostra.

Após realizar estes procedimentos, foi feito os testes para confirmação do *Clostridium Perfringens*, o pode ser escolhido dois dentre os três principais, sendo eles, o teste de coloração de gram como o primeiro. Neste teste escolheu-se 10 colônias isoladas, incubando em 10 tubos contendo o meio tioglicolato fluido e em banho-maria a $46 \pm 1^\circ\text{C}$ por cerca de 24 horas. Após o período de incubação, realizou-se o teste de coloração de Gram para confirmar a presença de bastão Gram positivo. Por fim, realizou-se o segundo teste, sendo ele, a prova de gelatinase. Nesta prova, semeou-se para o meio lactose-gelatina o inóculo em meio tioglicolato fluido, usando golpe em profundidade com agulha de níquel-cromo, incubou-se a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, em anaerobiose. Observou-se a produção de gás no meio e mudança de coloração de vermelho para amarelo, indicando que houve fermentação da lactose com produção de ácido. Os tubos com mudança de coloração para amarelo foram incubados em geladeira por cerca de 1 hora. *C. perfringens* é gelatinase positiva, portanto, o meio permaneceu-se líquido.

4.6.3. *Staphylococcus coagulase* positiva

Inicialmente as placas foram inoculadas com 0,1mL de cada diluição pela técnica do espalhamento, as mesmas foram incubadas a $35-37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48h e após esse período, as colônias presuntivas típicas e atípicas de estafilococos coagulase positiva foram contadas, considerando-se como típicas, aquelas circulares, lisas, convexas, negras com textura úmida, bordas esbranquiçadas e rodeadas por uma zona opaca e frequentemente com um halo transparente e como colônias atípicas, aquelas negras ou acinzentadas com um ou dois halos e também aquelas sem os halos.

Três a cinco colônias típicas e atípicas de estafilococos coagulase positiva por placa foram selecionadas e transferidas para tubos contendo Ágar TSA (Tryptic Soy Ágar) e incubados a $35-37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h. Após esse período, as culturas foram repicadas para caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a $35-37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h. Seguidamente, a partir dos tubos de caldo BHI, foi realizado o teste de coagulase e a partir dos tubos de ágar TSA foram realizados os testes de Gram, aglutinação em látex e catalase.

Para o teste de coagulase, 0,1mL da cultura em caldo BHI adicionou-se a um tubo contendo 0,3mL de plasma de coelho com EDTA reidratado. Seguindo-se a incubação a $35-37^\circ\text{C}$ e observando a formação dos coágulos por 6h. Foram considerados positivos os coágulos +3 e +4. No caso do teste de aglutinação em látex (Staphylect Plus), uma alçada carregada da cultura obtida em ágar TSA foi misturada ao reagente de látex contido no cartão de reação e também submetido ao teste com o reativo controle. Foram consideradas positivas as colônias que produzirão aglutinação no reagente de látex em até vinte segundos

O número de UFC/g ou mL foi calculado em função do número de colônias típicas e/ou atípicas obtidas, fator de diluição e porcentagem de colônias confirmadas.

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises físico-químicas, microbiológicas e a avaliação do crescimento das bactérias ácido lácticas probióticas, foram realizadas ao longo do período de 90 dias de vida útil dos três ensaios, a cada 15 dias. Com base nos resultados que foram obtidos essas análises, fez-se necessário a comparação entre os ensaios em relação aos valores finais obtidos, utilizando para isso a ferramenta estatística de desvio padrão a fim de avaliar e verificar a existência significativa de variação entre os resultados dos ensaios, a partir dos diferentes parâmetros avaliados.

O desvio padrão foi calculado a partir da Equação 27.

$$DP = \sqrt{\frac{\sum(Xi - Ma)^2}{n}} \quad (27)$$

Onde:

\sum = Somatório de todos os termos da posição inicial (i=1) a final (n);

Xi = Valor da posição inicial (i) do conjunto de dados;

Ma = Média aritmética dos dados;

n = Quantidade de dados.

4.8. CURVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO

As curvas de crescimento microbiano foram encontradas, a partir da contagem do crescimento das bactérias ácido-lácticas (BAL) durante os 84 dias de vida útil das amostras, as quais foram observadas e analisadas em um período de 15 em 15 dias.

Para obter as curvas de crescimento destes microrganismos, as quais foram aplicadas para o ajuste das modelagens matemáticas, foram realizadas varreduras de diferentes concentrações em diluições de 10^{-1} a 10^{-10} na contagem das bactérias ácido-lácticas (BAL) para os *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, a fim de estabelecer a melhor diluição no qual ocorresse a fermentação e crescimento mais adequados aos ajustes matemáticos.

4.9. MODELAGENS E VALIDAÇÕES MATEMÁTICAS

A partir das contagens das bactérias ácido-lácticas pôde-se fazer algumas curvas de crescimento microbiano para o crescimento das mesmas contadas quinzenalmente ao longo dos 84 dias totais de vida útil. Posteriormente, utilizou-se as curvas para aplicar em dois modelos matemáticos escolhidos para este trabalho, os quais são muito eficientes para validar e ajustar crescimento microbiano em produtos alimentícios.

Dois modelos matemáticos selecionados para a modelagem e obtenção de alguns parâmetros importantes diante do crescimento do

Lactobacillus paracasei e *Lactobacillus casei* na salsicha: o modelo de Baranyi e Roberts (BAR) e de Gompertz (GOM).

Os ajustes das curvas do crescimento foram feitos no software MicroFit (Instituto Nacional da Propriedade Industrial, protocolo geral (BR51201550002023), tornando possível o ajuste automático de dados experimentais a modelos microbiológicos de crescimento teórico, possibilitando a criação, o ajuste e validação matemática através de cálculos estatísticos de novos modelos de forma fácil e rápida. O mesmo foi utilizado para que possa contribuir para a melhoria da segurança alimentar de produtos perecíveis como derivados de carnes, ou predizer o tempo de vida dos produtos com ou sem adição de conservantes químicos. As curvas foram geradas neste software para que fosse possível testar e validar o experimento obtendo uma concentração dos microrganismos em função do tempo e pH na fase de crescimento dos mesmos. Para isto, selecionou-se o perfil dos dados necessários para que o programa exibisse o resultado dos ajustes e valores dos parâmetros desejados através das equações anteriores já mencionadas no presente trabalho (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. PRODUÇÃO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME

Durante o processo de produção do embutido fermentado, foram acompanhadas as contagens iniciais para inoculação dos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, bem como o pH das amostras.

A análise inicial do pH foi realizada em quintuplicata e a contagem inicial dos *Lactobacillus* realizada antes de inocular os mesmos nos ensaios S2 e S3 dos salames, sendo introduzidos na formulação número de células viáveis de 10^7 UFC e 10^6 UFC, para o *L. paracasei* e *L. casei*, respectivamente.

O parâmetro pH está representado na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores do pH durante o processamento dos salames

| Ensaio | Tipo do Salame | pH inicial do Salame antes da fermentação | pH final do Salame depois da maturação |
|--------|---------------------|---|--|
| S1 | Padrão | 5,82 ^a ± 0,14 | 5,19 ^a ± 0,03 |
| S2 | <i>L. casei</i> | 5,85 ^a ± 0,03 | 5,02 ^a ± 0,02 |
| S3 | <i>L. paracasei</i> | 5,75 ^a ± 0,01 | 5,04 ^a ± 0,01 |

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Autor, 2022.

No início da produção percebeu-se que os valores de pH entre as formulações apresentaram valores próximos, indicando padronização da metodologia e qualidade das matérias-primas que foram utilizadas para a produção dos embutidos fermentados. Os resultados iniciais de pH obtidos estavam de acordo com estudos apontados de Ordóñez *et al.*, 2005; Andrade, 2006; Carvalho, 2014, sobre este mesmo produto os quais também introduziram probióticos na massa cárnea, sendo nestes estudos contendo pH inicial entre 5,7 e 6,0. Esses resultados indicam que o pH do salame está de acordo com o valor da carne de cordeiro que se encontra entre 5,3 e 6,0. Além

disso, valores acima desta taxa podem indicar problemas futuros para o consumo, devido ao aparecimento de deteriorantes químicos ou biológicos.

Após o processo de maturação, percebe-se um declínio nos valores de pH obtidos após a etapa de fermentação. Nesta etapa a cultura *starter* desempenha importante função, pois é responsável por fermentar as fontes de carboidratos do meio, no caso das formulações desta pesquisa utilizou-se a sacarose, liberando ácido lático e reduzindo o pH do meio nos primeiros dias, bem como podem produzir metabólitos que auxiliam no desenvolvimento das características tecnológicas e sensoriais e na qualidade microbiologia do produto (INÔ *et al.*, 2021).

A queda do pH nos embutidos fermentados, de 6,0 para 5,5 nos resultados de Inô, 2021 e Downes, 2001, ocorre durante e após a fermentação, condizendo com os resultados obtidos na Tabela 3 deste estudo para os Ensaios S1, S2 e S3, sendo esta queda responsável por tornar o meio mais protegido principalmente contra a ação de bactérias gram negativas indesejáveis constituindo a base para segurança microbiológica do salame. Nas formulações dos Ensaios S2 e S3 por apresentarem *Lactobacillus*, durante o processo de fermentação, os valores de pH apresentaram uma redução ainda maior quando comparado com o Ensaio padrão S1 que estava utilizando apenas cultura *starter*. Este declínio do pH durante os primeiros dias de fermentação e maturação promove a garantia de qualidade dos salames devido à inibição de microrganismos indesejáveis, como *E. coli* e *S. aureus*, bem como a conversão, estabilização da cor e formação de compostos desejáveis, os quais fornecem sabor e aroma ao produto (FIEIRA, 2014; LIMA *et al.*, 2011).

O processo de maturação foi realizado durante 22 dias mantendo a umidade e temperatura controladas, sem variação ao longo do tempo para finalizar a fabricação dos salames. Nessa etapa, a ativação do processo aconteceu devido às culturas *starters* que promovem a redução de nitrato em nitrito, na formulação S1, a qual foi à única que foi acrescida de nitrito e nitrato, devido ao potencial antimicrobiano destes compostos, a fim de serem substituídos por cepas probióticas bioconservantes nas formulações S2 e S3. O ponto ótimo para essa reação está em pH 5,6 a 6,0, enquanto que em pH

abaixo de 5,4, o processo começa a inativar-se, por isso a mesma acontece logo nos primeiros dias da maturação, sendo adequado ocorrer em uma temperatura entre 15 e 18° C, devido à integridade e qualidade da gordura que pode ser comprometida e degradada em caso de temperaturas mais elevadas.

No final da maturação, a acidificação se permanece atingindo níveis de pH de 5,0 a 5,3 coincidindo com o ponto isoelétrico das proteínas da carne, o qual acontece a liberação mais rápida da água do produto, proporcionando redução na capacidade de retenção de água da carne, o que facilita a secagem do produto final (MENDES *et al.*, 2014).

Por fim, no processo de armazenamento, ocorre uma mudança no produto, segundo os resultados apresentados a qual depende principalmente da acidez inicial do produto que se encontra adequada aos resultados esperados como pH inicial antes da fermentação, considerando que o mesmo irá sofrer uma queda nas etapas de fermentação e maturação, esta mudança também depende da temperatura de armazenamento sendo indicada de preferência em ambiente resfriado, bem como do poder acidificante da cultura *starter* e do resfriamento do produto, o qual é responsável por cessar a atividade fermentativa em casos inadequados (COELHO *et al.*, 2009; DA SILVA *et al.*, 2013).

5.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises foram realizadas no tempo 0 após maturação, início da vida útil do produto, bem como no tempo 84, ao encerrar o prazo de validade. As mesmas apresentaram resultados de acordo com os preconizados na RDC nº60 (BRASIL, 2019), como descritos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Resultados da avaliação microbiológica realizada na amostra de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina no tempo 0 após maturação

| Ensaio | <i>Escherichia coli</i> (UFC/g)* | <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)* | <i>Salmonella</i> em 25g (UFC/25g)** |
|----------------|-------------------------------------|---|---|
| S1 | $<1,00 \times 10^1$ | $<1,00 \times 10^1$ | Ausência*** |
| S2 | $<1,00 \times 10^1$ | $<1,00 \times 10^1$ | Ausência*** |
| S3 | $<1,00 \times 10^1$ | $<1,00 \times 10^1$ | Ausência*** |
| Legislação**** | $<2,00 \times 10^1$ | $<1,00 \times 10^2$ | Ausência*** |

Ensaio 1: Salame padrão sem probiótico.

Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

* Valores expressos em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g);

** Valores expressos em unidades formadoras de colônia por 25 gramas (UFC/25g);

*** Resultado expresso representa ausência de crescimento considerando o limite do método;

**** Resolução RDC nº60 de 2019 (BRASIL, 2019).

Fonte: Autor, 2022

Tabela 5 - Resultados da avaliação microbiológica realizada na amostra de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina no tempo 84.

| Ensaio | <i>Escherichia coli</i> (UFC/g)* | <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g)* | <i>Salmonella</i> em 25g (UFC/25g)** |
|----------------|-------------------------------------|---|---|
| S1 | $<1,00 \times 10^1$ | $<1,00 \times 10^1$ | Ausência*** |
| S2 | $<1,00 \times 10^1$ | $<1,00 \times 10^1$ | Ausência*** |
| S3 | $<1,00 \times 10^1$ | $<1,00 \times 10^1$ | Ausência*** |
| Legislação**** | $<2,00 \times 10^1$ | $<1,00 \times 10^2$ | Ausência*** |

Ensaio 1: Salame padrão sem probiótico.

Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

* Valores expressos em unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g);

** Valores expressos em unidades formadoras de colônia por 25 gramas (UFC/25g);

*** Resultado expresso representa ausência de crescimento considerando o limite do método;

**** Resolução RDC nº60 de 2019 (BRASIL, 2019).

Fonte: Autor, 2022

Nos ensaios microbiológicos realizados no presente trabalho, a presença de *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* não foram detectadas em nenhuma amostra para nenhum dos tempos avaliados, representando não contaminação microbiana durante todo o prazo

de validade dos produtos. Esta percepção também está presente na baixa alteração do pH do produto, que apesar do salame apresentar elevada umidade e atividade de água, com pH ácido variando entre 5,3 e 5,0, é possível evitar a deterioração do alimento, controlando estes fatores para melhorar sua qualidade e não promover um risco à saúde pública dos consumidores devido à produção de micotoxinas (FRANCO; LANDRAF, 2008; GOMES, 2020).

O *Staphylococcus* coagulase positivo quando presente em alimentos é identificado como um indicador de contaminação a partir de pele, boca e das fossas nasais dos manipuladores, bem como representa uma insatisfatória limpeza e sanitização dos equipamentos utilizados na fabricação (SIQUEIRA, 2004). Diante disso, segundo os resultados dos três ensaios terem se mostrado abaixo do mínimo exigido na legislação vigente, demonstrou-se que o processo de fabricação dos embutidos fermentados seguiu de forma adequada as Boas Práticas de Fabricação e Manipulação, mantendo a higiene, limpeza e cuidado dos manipuladores, bem como boas condições de armazenamento durante o período de vida útil, assegurando desta forma a qualidade e segurança do produto final. Além disso, este gênero *Staphylococcus* pode apresentar uma queda de crescimento conforme a presença dos gêneros *Lactobacillus* se desenvolvendo no mesmo meio do patógeno e também devido ao pH abaixo de 5,3, tendo em vista seu pH ótimo de crescimento entre 7,0 a 7,5; com isso, pode-se avaliar que ao longo do tempo de vida útil principalmente nos Ensaios S2 e S3, a possibilidade do surgimento de *Staphylococcus coagulase postiva* é mínima.

Em relação à determinação de *Salmonella spp*, todas as amostras analisadas apresentaram ausência em 25 gramas, estando em acordo com o preconizado pela legislação. Esta bactéria quando presente em alimentos é responsável por uma fonte potencializadora de surtos alimentares em seres humanos, os quais são conhecidos como salmonelose. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos de embutidos fermentados apresentando não só cultura starter na composição como também acrescidos de culturas probiótica, as quais apresentam a capacidade de competir nutrientes do meio com as microbiotas patogênicas, reduzindo assim a

possibilidade de desenvolvimento de bactérias como a *Salmonella* (RUIZ, 2011; CARVALHO, 2014).

Diante do exposto, as culturas *starters* quando adicionadas em embutido fermentado apresentam a função de inibir microrganismos patógenos aumentando a vida de prateleira, devido a redução de pH, por isso são denominadas protetoras. Porém, tem se utilizado juntamente as *starters*, culturas probióticas também com função protetoras, sendo chamadas de funcionais, pois além de contribuir para qualidade nutricional e microbiológica, as mesmas apresentam a capacidade de auxiliarem na promoção da saúde do consumidor, bem como influenciam na inibição dos microrganismos patógenos em conjunto com as culturas *starters* durante todo o tempo de armazenamento dos embutidos fermentados, promovendo a garantia de um alimento mais seguro (MACEDO, PFLANZER, GOMES, 2011).

Como indicativo das condições higienicosanitárias de processamento dos embutidos e da ação inibitória das culturas bacterianas adicionadas aos embutidos sobre a flora contaminante tem-se a contagem de *Escherichia coli*. Dentre outras pesquisas de salames acrescidos de *Lactobacillus* e *Bifodobacterium* também houve a constatação da inibição da *Escherichia coli*, como no presente trabalho o qual o resultado se mostrou abaixo da legislação vigente, demonstrando desta forma que a presença de cepas probióticas influencia na inibição deste patógeno, mantendo um produto final íntegro com garantia de qualidade e segurança para o consumo. Além disso, o pH baixo no processo de fermentação e maturação também auxiliam na redução da deterioração do alimento por microrganismos indesejáveis promovendo uma melhor conservação ao produto (BIS-SOUZA *et al.*, 2019; GOMES, 2020).

5.3. ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Os resultados obtidos das características físicas e físico-químicas dos embutidos fermentados tipo salame de carne ovina estão descritos na Tabela 6 e 7. As mesmas foram comparadas com valores estabelecidos na legislação IN nº 22 (BRASIL, 2000).

Tabela 6 - Composição físico-químicas de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina

| Amostra | Lipídeos (%) | Proteína (%) | Carboidratos totais (%) | Cinzas (%) |
|------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| S1 | 30,69 ^a ± 0,00 | 35,05 ^a ± 1,66 | 9,62 ^a | 2,98 ^a ± 0,00 |
| S2 | 33,85 ^a ± 0,08 | 33,19 ^a ± 1,89 | 11,59 ^a | 2,65 ^a ± 0,00 |
| S3 | 29,72 ^a ± 0,03 | 31,14 ^a ± 1,94 | 8,06 ^a | 2,64 ^a ± 0,00 |
| Legislação | Máx. 35,00 | Mín. 20,00 | Máx. 4,00 | - |

Médias seguidas de mesma letra sobrescrita nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Ensaio 1: Salame padrão sem probiótico.

*Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

*Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, retirada a média e acrescida do desvio padrão, por fim, os valores foram comparados a legislação IN n°22 (BRASIL, 2000).

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 7 - Composições físicas e físico-químicas de embutido fermentado tipo salame de carne ovina

| Amostra | Colorimetria | Textura (KgF) | Valor Calórico (Kcal) | Acidez (g/mL) |
|---------|---|--------------------------|-----------------------|---------------|
| S1 | L= 41,26 ± 0,53 a*= 12,71 ± 0,95 b*= 10,98 ± 0,66 | 6,53 ^a ± 1,63 | 454,89 | 9,42a ± 0,01 |
| S2 | L= 35,62 ± 0,83 a*= 10,82 ± 0,94 b*= 7,88 ± 0,71 | 4,25 ^a ± 1,41 | 483,76 | 14,14a ± 0,00 |
| S3 | L= 49,97 ± 0,57 a*= 9,04 ± 0,27 b*= 11,53 ± 0,46 | 9,45 ^a ± 1,42 | 427,27 | 7,48a ± 0,01 |

Médias seguidas de mesma letra sobrescrita nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Ensaio 1: Salame padrão sem probiótico.

*Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

*Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, retirada a média e acrescida do desvio padrão, por fim, os valores foram comparados com outros estudos, visto que não há parâmetros estabelecidos para estas análises nas legislações.

Fonte: Autor, 2022

Segundo a legislação vigente, o teor de gordura do salame é no máximo 35,00%, o que demonstra coerência nos valores médios encontrados dos 3 ensaios produzidos. Nestes valores deve-se considerar a utilização de toucinho nas formulações que contém alto teor de lipídeos, porém principalmente a carne de origem ovina utilizada para a produção dos salames, a qual apresenta baixo teor de lipídeo na carne *in natura* entre 2,00 e 6,00% segundo alguns estudos, o que se correlacionam com os resultados obtidos no produto final que se mantiveram mais baixos que o padrão da legislação (BRASIL, 2000; FERRÃO, 2006; ZEOLA, 2004).

Alguns estudos de embutidos fermentados tipo salame também indicam resultados dentro dos padrões para o teor de lipídeos, com valores médios entre 25 e 32 %. Quando comparados com embutidos fermentados acrescidos de *Lactobacillus* nas formulações, mostram-se valores médios

maiores, entre 34 e 35%, o que condiz com os resultados obtidos neste trabalho, demonstrando um elevado teor lipídeos, porém se mantendo dentro dos padrões exigidos pela legislação (RDSELOND *et al.*, 2018; INÔ, 2021).

O teor de lipídeo pode variar na carne ovina devido alguns fatores, como a raça, alimentação fornecida ao animal, idade e sexo. Apresentam como principais funções as alterações na fração lipídica sendo esta a hidrólise dos triglicerídeos pelas lipases liberando ácidos graxos livres, os quais são responsáveis pela contribuição do sabor, textura e aparência dos produtos. Sob o ponto de vista fisiológico, são fonte de vitaminas, ácidos graxos essenciais e de energia (TABENELLI *et al.*, 2012; VEDOVATTO *et al.*, 2019). Além disso, a gordura da carne apresenta características tamponantes, pois protege os microrganismos probióticos nos salames das condições adversas do trato gastrointestinal, bem como apresenta uma importante função tecnológica de determinar a vida de prateleira do produto devido ao controle da oxidação lipídica na forma de conservação adequada, podendo levar a produção de substância como o malonaldeído, prejudicial à saúde (VEDOVATTO *et al.*, 2019; LÜCKE, 2000).

De acordo com a Tabela 6, os valores encontrados em relação ao teor de proteína apresentaram-se condizentes em relação aos padrões mínimos exigidos pela legislação IN n°22/2000 em no mínimo 20,00%, sendo os valores médios obtidos nas análises dos três ensaios, 35,05%; 33,19% e 31,14% (BRASIL, 2000).

A possível causa dos valores elevados de proteína pode ser atribuída à origem da carne utilizada na produção dos ensaios, isso porque a carne ovina *in natura* apresenta maior teor de proteína quando comprada com a carne bovina ou suína, se mantendo entre 19,1% a 20%. Além disso, durante a produção do salame acrescentam-se outros ingredientes, como por exemplo, toucinho, cujo também apresenta percentual de proteína em sua composição, permitindo que o produto final derivado desta formulação aumente o resultado médio deste macro nutriente. As proteínas são os principais componentes funcionais e estruturais de carnes processadas, sendo a partir da degradação das mesmas, a transformação em peptídeos e aminoácidos, durante o

processamento dos salames, o qual provoca alterações benéficas, contribuindo com a formação do *flavour* característico do produto final (VEDOVATTO *et al.*, 2019).

O salame quando comparado pela Tabela de composição dos alimentos (TACO, 2011), apresenta o resultado de proteína em média 25,9%. Valores elevados ocorreram com as análises realizadas em outro trabalho de embutido fermentado com inoculação de *Lactobacillus*, sendo estes entre 30,88% e 38,48% em um estudo, e 33,99% a 36,82% e um segundo estudo, estando estes resultados compatíveis aos analisados no presente trabalho para produtos prontos para consumo (DEL NOBILE *et al.*, 2009; ROSELINO, 2016).

O teor de carboidratos avaliados é de grande importância, pois compõe a formulação cárnea dos embutidos fermentados e são responsáveis pela produção de ácido láctico das bactérias, visto que, as mesmas utilizam esta fonte de energia para realizar essa reação. Além disso, auxilia na garantia da segurança e qualidade dos produtos finais, pois possui efeito protetor contra diversos microrganismos indesejáveis como o *Staphylococcus aureus* (TOMHÉ, *et al.*, 2014).

Diante disso, em relação a este parâmetro os resultados encontrados neste trabalho se mantem acima do permitido pela legislação vigente (BRASIL, 2000). Já na Tabela TACO o valor encontrado como padrão mostra-se como 2,90%, o que confirma o resultado (TACO, 2011). Este fato deve-se principalmente pela adição complementar de sacarose aos ensaios de embutidos devido a inoculação de *Lactobacillus*, os quais necessitam de fonte de carboidrato para se desenvolver a longo do tempo de vida útil do produto final.

Considerando os ingredientes obrigatórios como a carne, toucinho e os ingredientes adicionais como sacarose para cultura *starter* e cepas probióticas, os resultados de carboidratos das diferentes formulações podem apresentar valores diferentes entre elas, bem como devem reduzir ao longo do tempo devido à utilização deste macro nutriente como fonte de energia para a produção de ácidos lácticos dos *Lactobacillus*. Resultados semelhantes com os encontrados neste estudo são demonstrados em embutidos fermentados que

também apresentaram adição de cepas probióticas, cujos valores são entre 6,70% a 7,19%. Estes valores quando foram comparados com embutidos não acrescidos de cepas bacterianas, demonstraram valores menores entre 4,81% a 6,26%, o que pôde-se confirmar que a presença de maior teor de sacarose introduzida na massa devido aos probióticos eleva consideravelmente o teor de carboidrato no produto final logo após o processo de maturação (ROSELINO, 2016).

Em relação às cinzas foi possível analisar os resultados obtidos na Tabela 7, valores médios de 2,98%; 2,65% e 2,64%, os quais apesar da legislação não apresentar um valor padrão para esta análise, foram comparados com a Tabela de composição dos alimentos (TACO, 2011), podendo-se encontrar o valor padrão de até 5,90%, o que condiz com os valores encontrados no presente estudo. Assim como os carboidratos, para o teor das cinzas também são avaliados os ingredientes obrigatórios e não obrigatórios na adição da massa do salame, como carne, toucinho, sacarose, sal, antioxidantes e sais de cura, demonstrando a importância do impacto que estas substâncias causam no valor de cinzas obtido no produto final (ROSELINO, 2016). Outros estudos que obtêm cepas probióticas na composição do salame apresentam valores em média entre 5,48% e 6,58% de cinzas acima dos encontrados neste trabalho (RECH, 2010; FELDMAN, 2015). Os principais motivos da quantidade de cinzas no produto podem estar relacionados às variações de umidade e quantidade de sal adicionado.

A partir das características é possível determinar o valor calórico, cujo não apresenta valores padrões estabelecido pelas legislações, porém comparando com a TACO, encontra-se um valor de 1665kcal, enquanto nos tratamentos S1, S2 e S3, tem-se 454,89; 483,76; 424,27kcal, respectivamente, o que demonstra uma baixa caloria nos produtos desenvolvidos para este trabalho, conseqüentemente mais aplicáveis em uma dieta mais controlada para os consumidores que controlar a quantidade de caloria ingerida por dia (TACO, 2011).

A acidez titulável tem como principal função conferir aroma e sabor, bem como manter a ácido característico no produto final. Este parâmetro não

apresenta valores estabelecido pela legislação, entretanto pode-se avaliar entre os 3 ensaios que o inoculado de *Lactobacillus casei* apresenta a maior acidez, o que indica uma maior produção de ácido láctico potencializada por este probiótico durante as etapas de fermentação e maturação. Em contrapartida o resultado obtido pelo Ensaio S2 contendo *Lactobacillus paracasei* obteve o menor valor de acidez, demonstrando desta forma, que esta bactéria não auxiliou as culturas iniciadoras na produção de ácido láctico para o produto final. Com isso, compreende-se que a cepa de *Lactobacillus casei* apresenta maior facilidade de desenvolvimento e multiplicação em meios cárneos.

Estudos de embutidos com adição de probióticos na composição mostraram valores os quais aumentaram ao longo do processo de fermentação e manteve-se em ascensão até o 28º dia de armazenamento, o que condiz com os resultados no presente trabalho, que apresentou acidez elevada nos tratamentos S1, S2 e S3 antes de 28 dias de armazenamento. Nestes estudos, ao final do processamento, a acidez se manteve entre 3 e 5 mL de NaOH/mL, sendo a acidez maior para embutidos com a presença de probióticos *Lactobacillus*, sendo resultados mais elevados quando comparados com os da pesquisa em questão, o que pode ter acontecido devido ao tempo e temperatura de maturação, bem como o gênero do *Lactobacillus* inoculado (ROSELINO, 2016). Entretanto, todos os ensaios demonstraram atividade fermentativa eficiente das culturas probióticas sobre os açúcares do meio.

A força de cisalhamento é avaliada para medir a textura dos salames, parâmetro importante para a avaliação sensorial do produto. Após o processo de maturação, os salames tendem a apresentar maior força de cisalhamento devido ao processo de secagem e reação bioquímicas que ocorrem durante esta etapa. Diante disso, como pôde-se perceber nos resultados obtidos, os valores encontrados foram 6,54kgF; 4,25kgF e 9,45kgF. Os mesmos estão diferentes entre si, pois estão relacionados com a diferença de umidade e atividade de água entre eles, sendo o ensaio 2 com menor força de cisalhamento e menor atividade de água e umidade, o que condiz com o resultado esperado.

A queda de umidade pode interferir negativamente na textura do salame, implicando em maior proteólise e conseqüentemente, maior maciez do produto final, característica não desejada para o salame, ou seja, quanto maior a força aplicada, mais rígida a textura do produto e conseqüentemente menos umidade e atividade de água presente (TERRA, 2005; HORITA *et al.*, 2011).

Lima (2009), avaliando salames obtidos com carne de cordeiro obteve força de cisalhamento entre 3,56 kgf e 5,38 kgf, resultados próximos aos encontrados nos Ensaio S1 e S2. Nos estudos de Savoldi (2019), perceberam-se valores entre 1,5 e 2,9 kgf, demonstrando salames menos rígidos, o que pode ser influenciado pelo tipo de carne e de salame. Para a análise instrumental do perfil de textura algumas propriedades devem ser consideradas em um alimento, tais como dureza, adesividade, fraturabilidade, coesividade, elasticidade, gomosidade e mastigabilidade (HLEAP; VELASCO 2010). A dureza pode ser caracterizada como a força necessária para que o alimento seja partido pelos dentes e está diretamente relacionada com as propriedades de coesividade e fraturabilidade, ou seja, quanto mais duro o alimento, maior tende a ser a força necessária de compressão dos dentes para que ocorra o rompimento do alimento (coesividade) e maior a força exigida para que o alimento se quebre (fraturabilidade) (HERRERO *et al.*, 2008; SAVOLDI *et al.*, 2019).

A determinação de cor apresenta a finalidade de avaliar as alterações de cor do salame diante dos tratamentos no início do tempo de armazenamento. A análise foi feita ao final da maturação dos salames, com medições realizadas diretamente sobre as amostras, em que “L^{*}” corresponde ao brilho, “a^{*}” ao índice de cor vermelha e “b^{*}” ao índice de cor amarela. Com isso, ao avaliar o resultado do presente trabalho encontrou-se valores de L^{*} sendo 41,26; 35,62 e 49,97 para o ensaio sem probiótico, com *L. casei* e *L. paracasei*, respectivamente. Os valores demonstram coerência com a determinação de umidade e atividade de água dos ensaios, visto que quanto mais água presente no produto maior à luminosidade do mesmo, pois a perda de água também pode ocasionar escurecimento, devido a isto, os valores encontrados para *L. casei* apresenta menor luminosidade quando comparados aos outros dois ensaios (FELDMAN, 2015).

Estes resultados foram compatíveis com estudos de Ruiz (2011) que durante o processo de armazenamento no início e no final de 150 dias obteve valores para L^* entre 41,1 e 44,7, com leve redução após 30 dias de armazenamento, o que deve ter ocorrido provavelmente a decorrência da heterogeneidade do produto, porém sem diferença significativa entre os tempos. Outros estudos apresentaram análises referentes até o dia 30 de armazenamento para 3 tratamentos, sendo eles também contendo culturas probióticas, sendo estes com uma média para o valor de L^* dos tratamentos de 45,70, considerando que o resultado para os ensaios contendo cepas bacterianas foram maiores demonstrando maior luminosidade, o que corrobora com o valor encontrado para *L. paracasei* no presente estudo (FELDMAN, 2015).

Em relação aos valores de a^* , observou-se um maior resultado para o ensaio sem adição de probióticos, seguido do ensaio com *L. casei* e *L. paracasei*. Considerando que o parâmetro a^* representa o índice da cor vermelha, demonstram que o Ensaio S1 apresentou menor escurecimento da cor natural vermelha da carne. A literatura mostra valores próximos quando avalia-se salames italianos, encontrando valores baixos, o que pode ser atribuído 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, além disso, a oxidação do pigmento nitrosomioglobina se transforma em metamioglobina, responsável pela queda da intensidade da cor vermelha na carne (WÓJCIAK *et al.*, 2012; FEINER, 2016). Diante do exposto, valores menores para o a^* também podem estar relacionados ao pH, que quanto menores, consequentemente maior produção de ácido láctico. Sendo assim, entende-se que a cepa probiótica causa uma diminuição no valor de a^* , pois aumenta a produção de ácidos lácticos principalmente nas etapas de fermentação e maturação (SIRINI *et al.*, 2020). Os resultados deste experimento também demonstraram coerência quando comparados a estudos do mesmo parâmetro em embutidos fermentados, com valores entre 11,20 no primeiro dia de estocagem, e 13,07 após 90 dias de estocagem, tempo próximo do presente

estudo, avaliando que o armazenamento também aumentou a intensidade do vermelho (KIM *et al.*, 2012).

A intensidade da cor amarela é representada pelo parâmetro b^* , sendo encontrado valores elevados e próximos entre si neste estudo para os 3 ensaios. Estes valores elevados podem ser correspondentes a oxidação lipídica, que aumenta a intensidade do amarelo através do nível de rancidez (RUIZ, 2011). A rancidez é uma anomalia característica do uso de BAL também como cultura iniciadora, já que estas bactérias 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). Os valores obtidos neste trabalho foram maiores quando comparados à literatura, nos quais é possível observar uma variação grande dos resultados. Alguns estudos ao analisar o parâmetro b^* para salames sem cultura iniciadora adicionada e salames com a adição de cultura iniciadora, puderam encontrar valores sendo 6,70 e 11,87, respectivamente (SAVOLDI *et al.*, 2019). Para embutidos fermentados com a inoculação de *L. casei* encontram-se também valores próximos aos mencionados, entre 6,85 e 7,08 para o parâmetro b^* , sem apresentar diferença estatística (GAO, LI; LIU, 2014).

Comumente, a luminosidade e variações de cores ao longo do período de estocagem reduzem, diante disso, alguns fatores são importantes para estabilidade destes parâmetros, como a embalagem a vácuo, a qual obtém uma elevada importância na cor do produto, sendo este fator importante na aceitabilidade do produto para o consumidor (GAO; LI; LIU, 2014).

5.3.1. Determinação de umidade e atividade de água

Os resultados das análises de umidade e atividade de água nestes períodos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Análises de umidade e atividade de água realizada nas amostras de embutidos fermentados tipo salame.

| Amostras | Aw – Dia 0 | Umidade (%) – Dia 0 | Aw – Dia 84 | Umidade (%) – Dia 84 |
|------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| S 1 | 0,95 ^a ± 0,00 | 40,90 ^a ± 0,03 | 0,93 ^a ± 0,00 | 43,91 ^a ± 0,01 |
| S 2 | 0,94 ^b ± 0,00 | 41,89 ^a ± 0,04 | 0,90 ^b ± 0,00 | 32,46 ^b ± 0,03 |
| S 3 | 0,96 ^a ± 0,00 | 44,56 ^a ± 0,04 | 0,92 ^a ± 0,00 | 38,66 ^c ± 0,02 |
| Legislação | Máx. 0,92 | Máx. 40,00 | Máx. 0,92 | Máx. 40,00 |

Médias seguidas de mesma letra sobrescrita nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Ensaio 1: Salame padrão sem probiótico.

*Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

*Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, retirada a média e acrescida do desvio padrão, por fim, os valores foram comparados a legislação IN n°22 (BRASIL, 2000).

Fonte: Autor.

Ao avaliar os resultados do teor de umidade no dia 0, observou-se que nenhum dos resultados apresentou-se conforme os padrões mínimos exigidos pela legislação em no mínimo 40,00% (BRASIL, 2000). Diante disto, o resultado também foi comparado ao valor de 34,7% encontrado na Tabela de composição dos alimentos, o que também mostrou diferença com a umidade presente neste trabalho (TACO, 2011).

Pode-se avaliar que os valores para os tratamentos S2 e S3 contendo *Lactobacillus* mantiveram o teor de umidade ainda mais elevado, condizendo com resultados obtidos em estudos com salames contendo cepas probióticas, estando entre 32 e 35% no produto acabado (RDSELOND *et al.*, 2018). Outro estudo contendo diferentes marcas de salame no mercado também pode-se identificar variação de umidade estando entre 29 e 40, valores próximos aos encontrados no final da maturação do salame deste estudo (TOMHÉ *et al.*, 2014). Sabendo-se que os valores de umidade de carne ovina são em média 73,6-78,51% e diante de novas pesquisas de salames sem adições de *Lactobacillus*, percebe-se que outros resultados constataram que três marcas já vendidas no mercado avaliadas, também apresentaram valores superiores

aos estabelecidos pela legislação. Estes resultados assemelham-se aos encontrados em Salames Tipo Coloniais onde 12 amostras foram avaliadas e 83,3% obtiveram valores de umidade acima dos indicados na legislação (STOLBERG, 2006), compreendendo que os principais fatores que influenciam a elevada umidade, pode-se ter como origem o teor de umidade da carne *in natura* acima de 70% impactando nos produtos derivados, o controle dos parâmetros físicos no processo de maturação e conservação do produto ao longo da vida útil, bem como a presença dos *Lactobacillus* mostrou impactar em um maior teor de umidade nos produtos finais.

Após 84 dias de armazenamento, pôde-se avaliar nos resultados de umidade que os valores encontrados foram 43,91%, 32,46% e 38,66% nos Ensaio S1, S2 e S3 do salame, sendo dentre eles apenas o ensaio 2 e 3, contendo probiótico na composição apresentou valores menores que o máximo estabelecido pela legislação de 40,00%, bem como próximos ao encontrado na TACO de 34,7% (TACO, 2011; BRASIL, 2000).

Diante do exposto, avaliou-se que os valores de umidade obtiveram uma queda nos Ensaio S2 e S3 e uma elevação no Ensaio S1 ao logo dos dias de estocagem no final da vida de prateleira do produto, compreendendo que a presença de cepas probióticas diminui a absorção de umidade relativa do ar, visto que o meio de conservação foi realizado de maneira adequada, com embalagem à vácuo sob refrigeração entre 5 a 10°C, além de reduzir a probabilidade de desenvolvimento de patógenos com a queda de umidade aparente. Alguns estudos sem cultura de *Lactobacillus* na composição de embutidos fermentados de carne ovina obtiveram como resultado valores de 42,44% para umidade, o qual condiz com o encontrado nesta pesquisa para o ensaio 1 (MANUEL, 2014). Entretanto outros trabalhos que avaliaram a umidade comparando amostras com e sem cultura bacteriana demonstraram resultados de 32,16% e 35,17%, sendo compatível aos valores obtidos para os Ensaio S1 e S2 do presente trabalho também para embutidos fermentados de carne ovina (CASSOL, 2018).

Paralelo à umidade, um dos principais parâmetros a serem avaliados em derivados cárneos é a atividade de água, o qual segundo a Tabela 8 os

resultados obtidos foram 0,95; 0,94 e 0,96 para os Ensaio S1, S2 e S3 no dia 0. Esses valores estão acima do exigido como máximo pela legislação, o que condiz com os resultados de umidade encontrados, visto que, quanto maior a umidade maior a água livre avaliada pela atividade de água em valores elevados, tornando também o meio mais favorável ao crescimento microbiano (BRASIL, 2000).

Alguns estudos demonstraram valores acima do estabelecido pela legislação, observados em lotes de marcas já vendidas no mercado, também condizendo com os altos índices de umidade observados (THOMÉ, 2014). Percebeu-se que os resultados de carne de ovino *in natura* podem ser encontrados entre 0,96 e 0,97, o que gera um impacto direto na alta atividade de água em produtos derivados desta matriz alimentícia. Roselino (2016) também avaliou salames com inoculação de *Lactobacillus* e obteve-se valores superiores aos padrões das legislações, sendo eles entre 0,93 e 0,97, mostrando coerência nos resultados encontrados no presente trabalho, indicando que a presença de cepas probióticas podem interferir no aumento da atividade de água do produto final.

De acordo com a legislação brasileira de embutidos fermentados, os valores de atividade de água devem ser iguais ou inferiores a 0,92, pois indicam o término do processamento e estabilidade do produto, garantindo a qualidade até o final do prazo de validade do mesmo, entretanto quando se obtém valores muito baixo de a_w , pode-se gerar problemas na textura dos embutidos, assim como a_w muito elevada pode-se reduzir a vida útil do alimento devido a facilidade de proliferação de patógenos nestas condições (TOMHÉ *et al.*, 2014). Muitos fatores podem influenciar na elevada atividade de água deste trabalho, como a relação da diminuição do pH que por se aproximar do ponto isoelétrico das proteínas (entre 5,0 e 5,2) diminuem a capacidade de retenção de água facilitando a desidratação do produto, a elevada umidade, a presença de cepas probióticas, condições da maturação e armazenamento (MAURIELLO *et al.*, 2004; PISACANE *et al.*, 2017).

Ao longo do tempo, após 84 dias de estocagem, o cenário de atividade de água no produto se modificou, tornando os resultados dos Ensaio S2 e S3

dentro dos padrões exigidos pela legislação de no máximo 0,92. Este resultado promove uma maior garantia da qualidade e segurança dos salames, demonstrando que ao longo do tempo a presença dos *Lactobacillus* reduz a presença de água disponível no meio o qual os microrganismos patógenos utilizam para se desenvolverem (BRASIL, 2000).

Estudos de embutidos fermentados contendo *Lactobacillus* na formulação também apresentaram queda ao longo do tempo de estocagem em relação à atividade de água, sendo valores encontrados entre 0,86 a 0,91 após 30 dias de armazenamento, resultados condizentes com os observados nesta pesquisa. A redução nesse parâmetro ocorreu durante o período de armazenamento sem nenhum ajuste na temperatura ou condição de armazenamento, mantendo sob refrigeração e embalagens à vácuo conforme recomendações (ROSELINO, 2016). Em trabalhos realizados com carne ovina para embutidos fermentados e culturas selecionadas com cepas probióticas, também observaram resultados menores para as formulações acrescidas de culturas microbianas quando comparadas a formulação padrão sem cultura, sendo valores encontrados 0,90 e 0,92, respectivamente para embutidos sem cultura e com cultura (CASSOL, 2018). Estes valores encontram-se compatíveis com os avaliados nesta pesquisa.

5.3.2. Determinação de pH

Os resultados das análises de pH estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Evolução do pH realizada nas amostras de embutidos fermentados tipo salame

| pH | | | | |
|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|
| Amostra/Dias | S 1 | S 2 | S 3 | Legislação |
| 0 - Antes | 5,82 ^a ± 0,14 | 5,85 ^b ± 0,03 | 5,75 ^a ± 0,01 | - |
| 0 - Depois | 5,19 ^a ± 0,03 | 5,02 ^b ± 0,02 | 5,04 ^a ± 0,01 | - |
| 14 | 5,35 ^a ± 0,01 | 5,13 ^b ± 0,03 | 5,20 ^a ± 0,01 | - |
| 28 | 6,04 ^a ± 0,02 | 5,11 ^b ± 0,01 | 6,14 ^a ± 0,05 | - |
| 42 | 6,02 ^a ± 0,09 | 5,36 ^b ± 0,06 | 6,44 ^a ± 0,10 | - |
| 56 | 6,23 ^a ± 0,10 | 5,28 ^b ± 0,01 | 7,47 ^a ± 0,04 | - |
| 70 | 6,47 ^a ± 0,06 | 5,37 ^b ± 0,03 | 7,64 ^a ± 0,08 | - |
| 84 | 7,14 ^a ± 0,06 | 5,53 ^b ± 0,03 | 8,09 ^a ± 0,03 | - |

Médias seguidas de mesma letra sobrescritas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*0 – Antes: Valores de pH na massa produzida antes da fermentação e maturação.

*0 – Depois: Valores de pH no salame logo após a maturação.

*Ensaio 1: Salame padrão sem probiótico.

*Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

*Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

Fonte: Autor.

Como pode-se observar a partir da Figura 9, todas as amostras após maturação demonstraram pH característico de salames, apresentando uma queda no valor ocorrido conforme o tempo de maturação de um mês, sendo após esse tempo no primeiro mês de armazenamento, o pH dos ensaios se elevou para acima de 6, exceto para o Ensaio S2. Isto demonstra coerência a partir do fato que o salame se acidifica ao longo do tempo devido à presença de ácido láctico produzido pelas bactérias ácido-lácticas, sendo este fato perceptível principalmente para o *Lactobacillus casei* se mantendo além do primeiro mês de estocagem, o que percebe-se que este probiótico se encontra em período de desenvolvimento em sua fase *lag* neste período de tempo do produto, o que não ocorre para o ensaio padrão e nem para o ensaio que contém *Lactobacillus paracasei*, demonstrando que este probiótico não apresenta o mesmo tempo de fase *lag* no meio cárneo que o Ensaio S2.

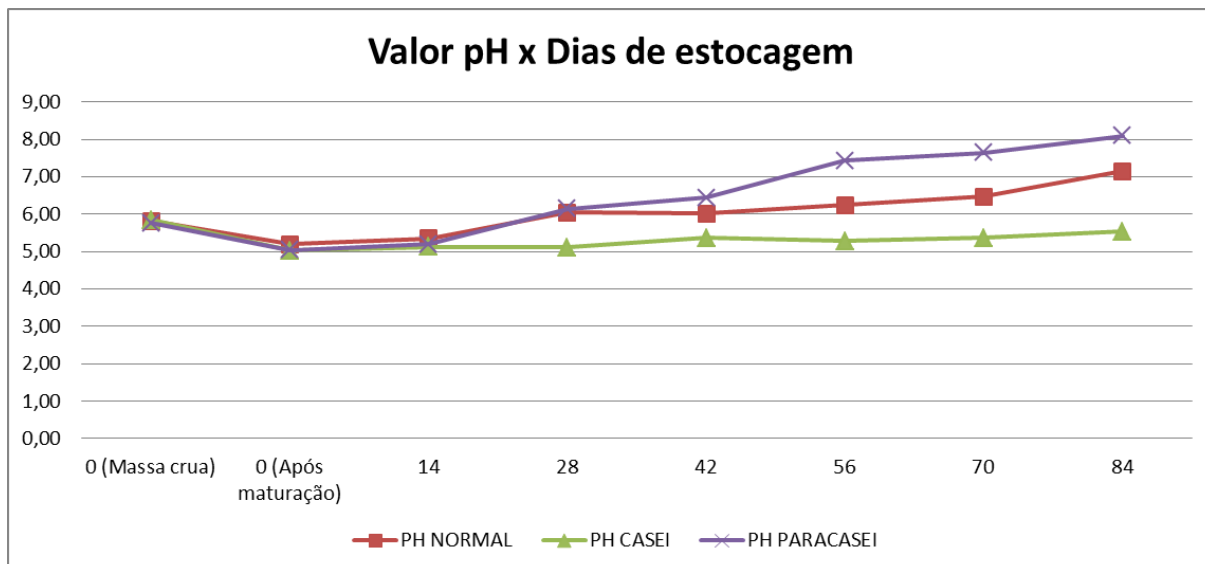


Figura 9 - Curva de pH durante o tempo de armazenamento dos embutidos fermentados

Fonte: Autor.

O pH final dos embutidos pode variar entre 4,6 a 5,5, o que pode depender de alguns fatores, como a velocidade de acidificação das culturas iniciadoras e da presença de leveduras que são capazes de elevar o pH do produto. Valores mais altos de pH, podem ser indícios de que o processo de fermentação pode não ter sido efetivo na produção de ácido láctico e são responsáveis por formar peptídeos, aminoácidos e compostos nitrogenados (SONG *et al.*, 2018; GOMES, 2020).

A carne de cordeiro apresenta um pH entre 5,3 a 6,0, o que condiz com os resultados obtidos na massa dos embutidos no dia da produção (SANTOS JUNIOR, 2007). Após a fermentação e maturação dos embutidos fermentados o pH tende a cair devido a produção do ácido-lático pelas culturas iniciadoras, cujo os probióticos inoculados auxiliam nessa queda principalmente nos primeiros dias após a maturação. Estes resultados estão coerentes com os valores obtidos na análise de acidez, sendo antes do dia 28 de armazenamento a maior acidez encontrada no Ensaio S2, de acordo com o menor pH encontrado no mesmo período. O acompanhamento do pH é de extrema importância para avaliar a estabilidade do produto, visto que sua queda depende da acidificação das bactérias ácido-láticas, o qual pode proporcionar perda de água e redução na capacidade de retenção de água da carne,

facilitando a secagem do produto e reduzindo sua atividade de água (PRADO *et al.*, 2019; GOMES, 2020).

Estudos utilizando *Lactobacillus* na composição de embutidos fermentados obtiveram resultados que variaram entre 4,98 e 5,26 no dia 30 de armazenamento, próximo aos encontrados nos Ensaio S1, S2 e S3 desta pesquisa. Isto ocorreu durante o primeiro mês de armazenamento sem diferença significativa entre os valores encontrados, indicando que a utilização das cepas probióticas não alterou o processo fermentativo de forma elevada neste período. Os valores de pH foram comparados no final do tempo de armazenamento de 84 dias com o final do período de maturação, as formulações dos Ensaio S1 e S3 apresentaram as maiores médias, demonstrando o quanto se elevaram a longo da vida útil, e conseqüentemente obtiveram uma queda na produção de ácido láctico a partir do primeiro mês de estocagem, o que não favorece o crescimento de bactérias probióticas. Isto indica que o *Lactobacillus paracasei* presente no Ensaio S3 não auxiliou na atividade fermentativa de forma eficiente por mais de 28 dias. O mesmo aconteceu em outro estudo de embutidos fermentados que elevaram seu pH durante o processo de armazenamento por 120 dias (ROSALINO, 2016). O eventual aumento do pH pode ser atribuído ao aparecimento de compostos básicos oriundos da degradação de proteínas e da diminuição de eletrólitos, bem como podem estar relacionados com o processamento inadequado ou ausência de controle da temperatura durante o armazenamento (DA SILVA *et al.*, 2013).

A verificação do pH nos embutidos cárneos é realizada afim de identificar um dos critérios de sua qualidade. Diante disso, quando tem-se valores de pH inferiores a 6,2 os produtos cárneos tornam-se mais protegidos contra a ação de microrganismos indesejáveis. Os valores de pH apresentados pelos produtos finais após 84 dias de armazenamento encontram-se acima deste limite recomendado para os Ensaio S1 e S3, os quais não pode-se garantir a segurança e qualidade empregada a estas formulações, mesmo somados ao fator temperatura baixas e à presença de cloreto de sódio, tendo em vista que o Ensaio S3 também não saís de cura que auxilia na conservação e promove sua estabilidade microbiológica (BIASUZ, 2018). Em pesquisas

realizadas utilizando culturas probióticas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* no processamento de embutido fermentado, demonstram que apresentam os menores valores de pH quando comparados com o processamento com a utilização apenas da cultura *starter*, sendo valores entre 4,5 e 5,0 no início e final do processo de maturação, os quais se encontram próximos ao resultado obtido no mesmo período para este trabalho, indicando que de fato a presença de culturas probióticas auxiliam as culturas iniciadoras na redução do pH através da maior produção de ácido láctico, melhorando a garantia da qualidade dos produtos (MACEDO *et al.*, 2008).

O período de *shelf-life* destas amostras foi de 84 dias totais. E ao longo deste tempo pode-se observar a diminuição do pH até o 28º dia e adequação destes valores para com o produto final, finalizando com pH mais elevados no 84º dia principalmente no ensaio 3. A variação deste pH está relacionado com a multiplicação de BAL, sendo assim, pode-se afirmar que no período de 84 dias o ensaio S1 continuou apresentando pH reduzido, com pouca diferença significativa quando comparada com o final do período de maturação, apresentaram desta forma, uma vida útil para consumo das bactérias ácido-lácticas ainda ativas e vivas para promover benefícios do organismo humano ao serem ingeridas, caso o produto seja mantido em locais e refrigeração adequada.

5.4. CONTAGEM DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Os resultados obtidos através das análises laboratoriais das bactérias ácido-lácticas presentes nos ensaios S2 e S3 de embutidos fermentados tipo salame contendo probióticos estão expressos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Contagem de bactérias ácido-lácticas ao longo do *shelf-life* dos embutidos fermentados tipo salame até o dia 28 de estocagem

| Amostras/Dias | Contagem bactérias ácido-lácticas (UFC/mL) | | | |
|---------------|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0 - Antes | 0 - Depois | 14 | 28 |
| Ensaio 2 | $1,61 \times 10^{10}$ | $1,64 \times 10^{13}$ | $4,00 \times 10^7$ | $1,35 \times 10^{15}$ |
| Ensaio 3 | $3,37 \times 10^{11}$ | $5,40 \times 10^8$ | $4,30 \times 10^{10}$ | $4,52 \times 10^{13}$ |

*0 – Antes: Viabilidade de BAL no momento da inoculação na massa produzida.

*0 – Depois: Viabilidade de BAL logo após a maturação do salame.

*Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

*Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

Fonte: Autor.

Tabela 11 - Contagem de bactérias ácido-lácticas ao longo do *shelf-life* dos embutidos fermentados tipo salame a partir do dia 42 de estocagem

| Amostras/Dias | Contagem bactérias ácido-lácticas (UFC/mL) | | | |
|---------------|--|--------------------|--------------------|-------------------|
| | 42 | 56 | 70 | 84 |
| Ensaio 2 | $4,52 \times 10^{13}$ | $1,20 \times 10^8$ | $1,82 \times 10^7$ | $2,3 \times 10^7$ |
| Ensaio 3 | $1,12 \times 10^{13}$ | $3,19 \times 10^7$ | $6,8 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ |

*0 – Antes: Viabilidade de BAL no momento da inoculação na massa produzida.

*0 – Depois: Viabilidade de BAL logo após a maturação do salame.

*Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

*Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

Fonte: Autor.

Observou-se a partir das Tabelas 10 e 11 que os Ensaios S2 e S3 dos embutidos fermentados tipo salame elaborados apresentaram contagens de bactérias ácido-lácticas viáveis e ativas durante todo o período de *shelf-life* de 84 dias de estocagem dos mesmos, demonstrando valores superiores a 10^8 UFC/mL, os quais conforme a legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2008), corresponde a quantidade mínima de microrganismos probióticos ativos e viáveis que devem ser entre 10^7 e 10^9 UFC/mL para que o produto tenha a alegação de funcional e garanta probióticos ativos no organismo humano afim de promover com eficiência seus benefícios.

A inoculação do gênero *Lactobacillus* nos embutidos fermentados pode auxiliar na inibição do desenvolvimento de culturas bacterianas patogênicas.

Alguns estudos observaram um crescimento exponencial da população de *Enterobacteriaceae* no tratamento sem adição de cultura iniciadora, entretanto quando o embutido fermentado apresentava adição de culturas probióticas *L. plantarum* CMRC6 combinado com *S. xylosus* SX16, constataram uma queda contínua da população de *Enterobacteriaceae*. Em outro estudo, cepas de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* FERM P-15121 e uma cultura comercial de *Lactobacillus sakei* inibiram a multiplicação e a produção de enterotoxina de *Staphylococcus aureus*. Percebeu-se também que *Lactobacillus casei* e *Enterococcus faecium* foram capazes de inibir a multiplicação de *Listeria monocytogenes* em salames através da produção de bacteriocinas. (ROSS; MORGAN; HILL, 2002; MUTHUKUMARASAMY; HOLEY, 2007; CHEN *et al.*, 2020).

Antes da maturação, logo após o embutimento, os salames apresentaram contagem acima de 10^7 UFC/mL o que permitiu serem considerados probióticos e dar prosseguimento para o processo de fermentação e maturação. Após estas etapas o crescimento de *Lactobacillus casei* aumentou consideravelmente e o *Lactobacillus paracasei* reduziu, indicando que o mesmo não se multiplicou de forma significativa durante a fermentação, entretanto ainda com células viáveis para o consumo humano. Ao longo do tempo o crescimento de ambas as cepas probióticas foram percebidas a partir das contagens bacterianas, identificando que o armazenamento e ausência de sais de cura não influenciaram negativamente na evolução destes *Lactobacillus*. O decaimento destas bactérias iniciou apenas a partir do dia 56 de estocagem, sendo mesmo após esse prazo com cepas viáveis acima de 10^7 UFC/mL, mostrando a viabilidade do produto até o dia 84 e completando desta forma o shelf-life do produto final sendo considerado funcional probiótico.

Estudos de salames com inoculação de cepas probióticas, demonstraram no 1º dia de embutimento valores de 6,52 log UFC/g e 8,25 log UFC/g. Durante o processamento, no 15º dia, observou-se um aumento no número de células viáveis de 8,64 log UFC/g e 7,73 log UFC/g para os diferentes tratamentos, o qual o segundo uma diminuição na contagem. Ao final do período de armazenamento no dia 45, os dois tratamentos apresentaram

crescimento das contagens, também se mantendo dentro dos valores estabelecidos pela legislação para serem considerados salames probióticos e estando coerente com o crescimento encontrado no presente trabalho ao longo do tempo de estocagem nos primeiros 45 dias (BRASIL, 2008; GOMES *et al*, 2020).

A contagem do número de células viáveis dos microrganismos probióticos *L. casei* e *L. paracasei* aumentou gradativamente após a etapa de maturação e após os primeiros 14 dias produzido, demonstrando assim, a atividade e ação dos mesmos ao longo desse tempo em quantidades viáveis para serem considerados alimentos com alegações funcionais. Nos 14 primeiros dias as amostras apresentaram uma contagem na ordem de 10^7 e 10^{10} UFC/mL para *L. casei* e *L. paracasei*, respectivamente, apresentando-se na fase *lag*, onde as bactérias ainda estão em fase de adaptação ao novo ambiente, sendo o pH e acidez os fatores de maiores influências para o crescimento das mesmas ao longo do tempo de vida útil dos embutidos.

Nos dias 28 a 42 observou-se os maiores crescimentos populacionais para ambos os embutidos, chegando a contagem na ordem de 10^{15} e 10^{13} UFC/mL para *L. casei* e *L. paracasei*, respectivamente, sendo essa, devido ao aumento de células presentes, considerada a fase *log* ou exponencial, onde as cepas estão em crescimento elevado no meio. Entretanto, observou-se uma redução de um ciclo logarítmico para as amostras dos embutidos fermentados funcionais a partir dos 70 dias de estocagem, chegando na fase de estabilização e declínio com $1,82 \times 10^7$ e $6,8 \times 10^7$ UFC/mL, onde os probióticos param de se desenvolver e iniciam a etapa de morte celular. Estes resultados cinéticos ao longo dos períodos de estocagem demonstram que as células viáveis mais ativas encontram-se entre o 14º ao 70º dia de armazenamento.

Dessa forma os embutidos garantem os probióticos ativos benéficos para o organismo nos primeiros 84 dias de consumo, embora demonstre o começo do declínio a partir deste período, devido à contagem ainda elevada, dentro dos padrões exigidos para serem considerados ativos. Este fato é perceptível quando se avalia os parâmetros de acidez, pH, umidade e atividade

de água adequados para auxiliar no crescimento populacional das cepas microbianas de *Lactobacillus* ao longo do tempo de armazenamento, principalmente nos primeiros 28 dias.

Muito embora o gênero *Lactobacillus* apresente uma tolerância em relação a acidez, ocorreu um decréscimo no seu número analisados sob condições ácidas, porém não o suficiente para torna-los inativos de suas funções probióticas. A sobrevivência das bactérias probióticas em produtos fermentados depende de diversos fatores, tais como interação entre as espécies presentes no alimento, condições de cultura, composição química do meio, acidez final do produto, conteúdo de sal, disponibilidade de nutrientes, promotores e inibidores do crescimento, oxigênio dissolvido, quantidade inoculada do probiótico, temperatura de incubação e tempo e temperatura de estocagem (SILVA, 2016).

Um dos principais influenciadores do crescimento microbiando é o pH, seu aumento pode ocorrer devido às reações de descarboxilação e desaminação de aminoácidos que liberam amônia, com isso ao adicionar culturas probióticas permite ainda uma melhor padronização do produto final (TABANDEH *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Entretanto, mesmo com essa variação os *Lactobacillus* se desenvolveram ao longo do tempo, e quando se compara os resultados desta pesquisa com outros estudos na literatura, obtém-se para embutidos acrescidos de *Lactobacillus acidophilus* no período do fim da maturação valores de 10^8 UFC/mL, após 90 dias de estocagem as formulações exibiram redução na população de *Lactobacillus spp* (ROSELINO, 2016).

Macedo e colaboradores (2008) avaliaram três cepas de *Lactobacillus spp.*, em associação com culturas iniciadoras comerciais, para a produção de salame probiótico., utilizando *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. casei*, as quais no final do período de maturação foi de $9,50 \times 10^7$; $5,50 \times 10^7$ e $3,45 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente. Estudos com *L. rhamnosus* e *L. paracasei* verificaram que estas cepas probióticas se desenvolveram em salames, obtendo população de células viáveis de 10^8 UFC/g no final do período de armazenamento, resultados próximos ao encontrados no final do período de

estocagem do presente estudo (COMAM *et al.*, 2012). Valores semelhantes foram encontrados também em cepas de *L. rhamnosus*, os quais foram constatados que esta cultura foi capaz de dominar a microbiota natural da carne em um salame fermentado espanhol, alcançando níveis de 10^8 UFC/g no final dos períodos de maturação e armazenamento. Já na avaliação de seis cepas de *Lactobacillus* spp. (*L. casei* CTC1677, *L. casei* CTC1678, *L. rhamnosus* CTC1679, *L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota) inoculadas em salames fermentados com redução de sódio e gordura, observou-se que somente *L. rhamnosus* foi capaz de se multiplicar e alcançar níveis de 10^8 UFC/g no final do período de maturação (RUBIO *et al.*, 2013; RUBIO *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos nesta pesquisa foram compatíveis aos valores encontrados nos estudos da literatura para embutidos fermentados cárneo inoculados de *Lactobacillus*, principalmente *L. casei* e *L. paracasei*. Além disso, com os valores encontrados confirmou a resistência a variação de pH e umidade e indicam que as cepas utilizadas na fermentação são capazes de sobreviver e se multiplicar na matriz cárnea utilizada. Apesar da redução numérica na população de microrganismos probióticos observada, uma ingestão diária superior a 10 g dos embutidos fermentados probióticos seria suficiente para respeitar as recomendações da ANVISA e para que os possíveis efeitos benéficos à saúde sejam observados.

5.5. APLICAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

O modelo de Robert e Baranyi foi escolhido, pois envolve um foco maior para explicações biológicas, gerando o que mostra a equação 28 a seguir. Este modelo apresenta uma equação considerada mais completa e complexa que as outras, e por este motivo costuma ajustar os dados de forma que apresentem mais precisão.

$$y = y_0 + mx + \ln. e^{-mx} + e^{-h} - e^{-mx-h} \quad (28)$$

Onde y é a variável de contagem de bactéria ácido láctica (\log_{10}) que possui relação direta com o tempo (x) medido em horas

Os parâmetros de crescimento modelados são:

Y_0 = valor inicial de crescimento médio de colônias no modelo;

m = Quantidade limite de crescimento médio de colônias no modelo;

h = taxa máxima de crescimento do tempo da fase exponencial.

Da mesma forma, o modelo de Gompertz tem sido utilizado com sucesso para descrever o comportamento microbiano em diferentes alimentos. Este modelo foi introduzido na microbiologia de alimentos com intuito de realizar a parametrização de uma curva de crescimento especificamente do *C. botulinum*, porém tem sido testado para outros microrganismos para avaliação de seu ajuste.

A reparametrização da equação de Gompertz foi proposta para obter a representação direta dos parâmetros de interesse para a aplicação mencionada, são estes: a velocidade específica máxima de crescimento microbiano e o tempo de duração da fase *lag*, resultando no Modelo de Gompertz Modificado que está descrito na equação 29.

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = A \cdot e^{-e^{-B(t-M)}} \quad (29)$$

Com base na equação 29, o programa computacional MicroFit, desenvolvido para ajustes de modelos matemáticos, reescreveu a função de Gompertz como descrita na equação 30.

$$y = c \cdot e^{-e^{-b(x-m)}} \quad (30)$$

Onde:

$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right)$ = logaritmo neperiano da densidade celular no tempo t ;

x = a absorbância final;

x_0 = a absorbância inicial, sendo e a absorbância é proporcional a concentração celular;

A = o aumento logaritmo da população

B = a velocidade relativa máxima de crescimento no tempo M [h⁻¹];

M = o tempo necessário para atingir a velocidade máxima de crescimento [h].

Podendo perceber a partir as duas equações que:

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = y;$$

X = tempo;

C = A.

De acordo com as equações 25 e 27 anteriores aplicou-se os valores do crescimento microbiano no software MicroFit para obtenção dos resultados das modelagens.

5.5.1. Cinética das bactérias ácido-lácticas

Os dados durante o período de armazenamento obtido a partir contagens das bactérias ácido lácticas do probiótico *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* nos embutidos fermentados tipo salame de carne ovina, encontram-se nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Cinética do crescimento populacional dos probióticos até o dia 28 de estocagem em horas

| Amostras/Horas | Contagem bactérias ácido-lácticas (\log_{10} UFC/mL) | | | |
|----------------|---|------------|--------|--------|
| | 0 - Antes | 0 - Depois | 336h | 672h |
| Ensaio 2 | 10,206 | 13,215 | 7,602 | 15,130 |
| Ensaio 3 | 11,528 | 8,732 | 10,633 | 13,655 |

*0 – Antes: Viabilidade de BAL no momento da inoculação na massa produzida.

*0 – Depois: Viabilidade de BAL logo após a maturação do salame.

*Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

*Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

Fonte: Autor.

Tabela 13 - Cinética do crescimento populacional dos probióticos a partir do dia 42 de estocagem em horas

| Amostras/Dias | Contagem bactérias ácido-lácticas ($10^{\log_{10}}$ UFC/mL) | | | |
|---------------|--|-------|-------|-------|
| | 1008h | 1344h | 1680h | 2016h |
| Ensaio 2 | 13,655 | 8,079 | 7,260 | 7,361 |
| Ensaio 3 | 13,049 | 7,504 | 7,832 | 7,041 |

*0 – Antes: Viabilidade de BAL no momento da inoculação na massa produzida.

*0 – Depois: Viabilidade de BAL logo após a maturação do salame.

*Ensaio 2: Salame com *Lactobacillus casei*.

*Ensaio 3: Salame com *Lactobacillus paracasei*.

Fonte: Autor.

Com base nos valores das Tabelas 12 e 13 aplicou-se os mesmos ao software MicroFit com o intuito de se obter os parâmetros das equações dos modelos propostos para os dois *Lactobacillus* e utilizá-los para os demais desenvolvimentos na validação destes mesmos modelos futuramente. Os principais parâmetros estão descritos na Tabela 14 para o *L. casei* e na tabela 15 para o *L. paracasei*, bem como a comparação dos dados obtidos experimentalmente e através das funções dos modelos estão dispostos nas Tabelas 16, 17, 18, 19.

Tabela 14 - Parâmetros estabelecidos a partir da equação do modelo de Baranyi e Roberts e modelo de Gompertz para o *L. casei*

| Parâmetros das equações | | | |
|-------------------------|--------|-------|--------|
| Modelo | Y0 | m | h |
| Baranyi e Robert | 7,847 | 6,316 | -3,218 |
| | c | b | m |
| Gompertz | 10,313 | 8,511 | -2,859 |

Fonte: Autor.

Tabela 15 - Parâmetros estabelecidos a partir da equação do modelo de Baranyi e Roberts e modelo de Gompertz para o *L. paracasei*

| Parâmetros das equações | | | |
|--------------------------------|-----------|----------|----------|
| Modelo | Y0 | m | h |
| Baranyi e Robert | 6,516 | 8,907 | -4,617 |
| | c | b | m |
| Gompertz | 9,996 | 19,607 | -25,632 |

Fonte: Autor.

Tabela 16 - Dados experimentais e ajustados pelo modelo de Gompertz para *L. paracasei*

| X | Y | Y(Modelo) | Erro (%) |
|------------|----------|------------------|-----------------|
| 0 - Antes | 11,53 | 9,997 | 15,32 |
| 0 - Depois | 8,732 | 9,997 | 12,65 |
| 336 | 10,63 | 9,997 | 6,36 |
| 672 | 13,66 | 9,997 | 36,59 |
| 1008 | 13,05 | 9,997 | 30,53 |
| 1344 | 7,504 | 9,997 | 24,94 |
| 1680 | 7,832 | 9,997 | 21,65 |
| 2016 | 7,041 | 9,997 | 29,57 |

Fonte: Autor.

Tabela 17 - Dados experimentais e ajustados pelo modelo de Baranyi e Roberts para *L. paracasei*

| X | Y | Y(Modelo) | Erro (%) |
|------------|--------|-----------|----------|
| 0 - Antes | 11,528 | 11,528 | 0,00 |
| 0 - Depois | 8,732 | 8,732 | 0,00 |
| 336 | 10,633 | 10,633 | 0,00 |
| 672 | 13,655 | 13,655 | 0,00 |
| 1008 | 13,049 | 13,049 | 0,00 |
| 1344 | 7,504 | 7,504 | 0,00 |
| 1680 | 7,832 | 7,832 | 0,00 |
| 2016 | 7,041 | 7,041 | 0,00 |

Fonte: Autor.

Tabela 18 - Dados experimentais e ajustados pelo modelo de Gompertz para *L. casei*

| X | Y | Y(Modelo) | Erro (%) |
|------------|--------|-----------|----------|
| 0 - Antes | 10,206 | 10,314 | 1,04 |
| 0 - Depois | 13,215 | 10,314 | 28,13 |
| 336 | 7,602 | 10,314 | 26,29 |
| 672 | 15,130 | 10,314 | 46,70 |
| 1008 | 13,655 | 10,314 | 32,40 |
| 1344 | 8,079 | 10,314 | 21,67 |
| 1680 | 7,260 | 10,314 | 29,61 |
| 2016 | 7,361 | 10,314 | 28,63 |

Fonte: Autor.

Tabela 19 - Dados experimentais e ajustados pelo modelo de Baranyi e Roberts para *L. casei*

| X | Y | Y(Modelo) | Erro (%) |
|------------|--------|-----------|----------|
| 0 - Antes | 10,206 | 10,314 | 0,00 |
| 0 - Depois | 13,215 | 10,314 | 0,00 |
| 336 | 7,602 | 10,314 | 0,00 |
| 672 | 15,130 | 10,314 | 0,00 |
| 1008 | 13,655 | 10,314 | 0,00 |
| 1344 | 8,079 | 10,314 | 0,00 |
| 1680 | 7,260 | 10,314 | 0,00 |
| 2016 | 7,361 | 10,314 | 0,00 |

Fonte: Autor.

ao observar os valores dos erros para o *L. paracasei*, analisando as Tabelas 16 e 17, obteve-se resultados melhores para o modelo de Baranyi e Roberts, o qual demonstrou o menor erro, sendo este com valor ideal igual à zero, como desejados, indicando desta forma uma adequação eficiente do modelo matemático em relação ao crescimento das bactérias ácido lácticas. Entretanto o mesmo não aconteceu para o modelo proposto de Gompertz, o qual apresentou erros elevados distante de zero, identificado que o crescimento microbiano não demonstrou uma boa adequação ao modelo matemático neste estudo.

Para o *L. casei*, ao observar os valores dos erros a partir das tabelas 18 e 19, pode-se avaliar resultados também melhores para o modelo de Baranyi e Roberts, os quais também demonstraram erro com valor igual à zero, tornando-se ideal, o que indica e confirma uma adequação eficiente do modelo matemático em relação ao crescimento das bactérias ácido lácticas, e isso pode ser afirmado para os dois *Lactobacillus* utilizados no presente estudo. Contudo, para o *L. casei*, o modelo proposto de Gompertz também não apresentou valores baixos de erros, o que demonstra erros elevados distante de zero e identifica que o crescimento microbiano não obteve uma boa adequação a este modelo matemático primário.

Essas divergências apontadas de adequação podem ser percebidas a partir das Figuras 10, 11, 12 e 13.

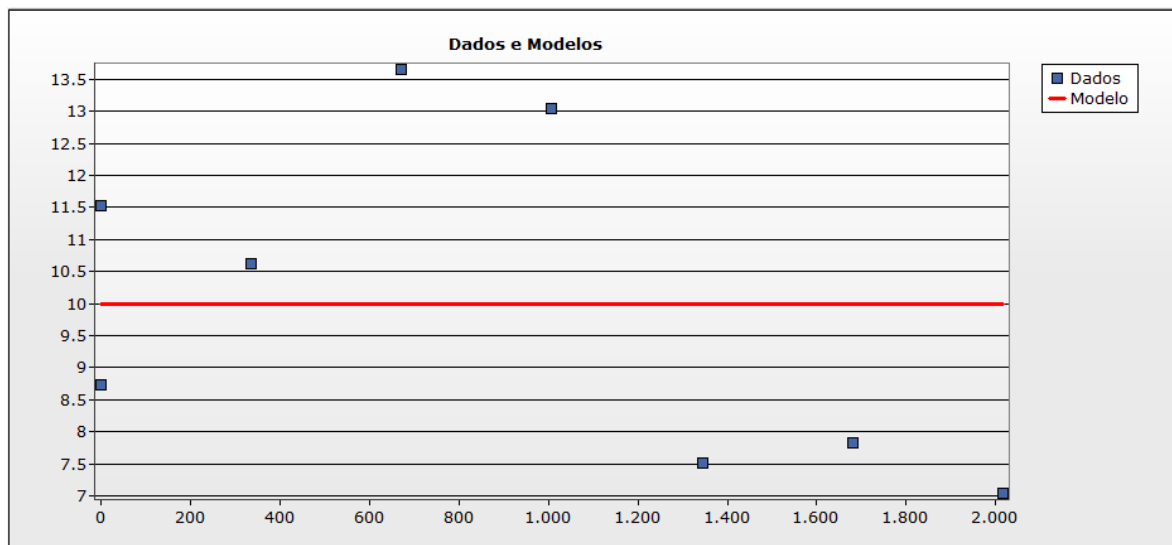


Figura 10 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Gompertz para *L. paracasei*

Fonte: Autor.

Onde o eixo x é o tempo em horas de processamento e o eixo y a contagem em \log_{10} UFC/mL.

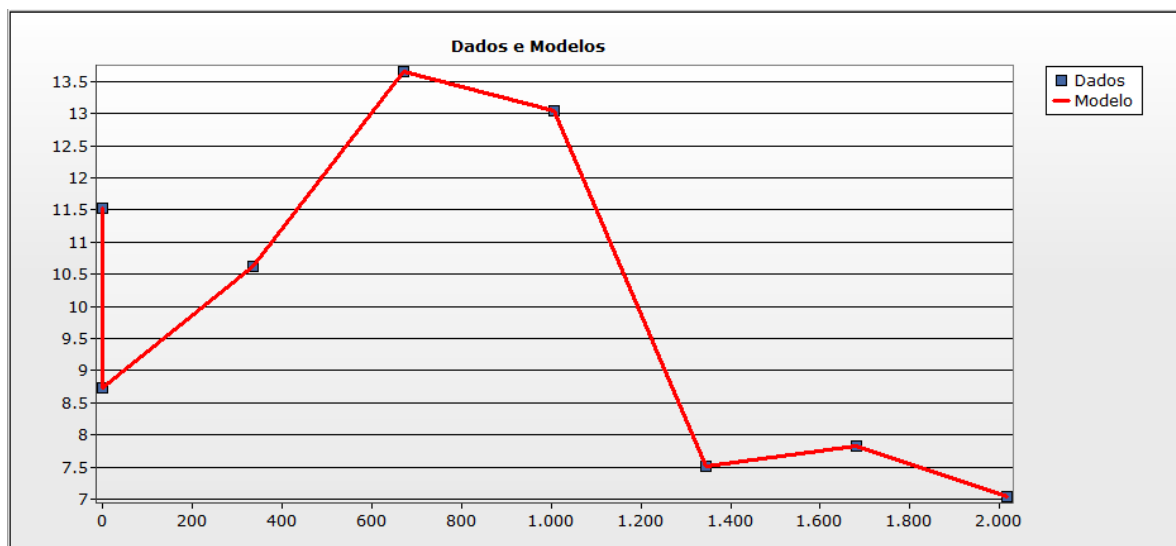


Figura 11 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Baranyi e Roberts para *L. paracasei*.

Fonte: Autor.

Onde o eixo x é o tempo em horas de processamento e o eixo y a contagem em \log_{10} UFC/mL.

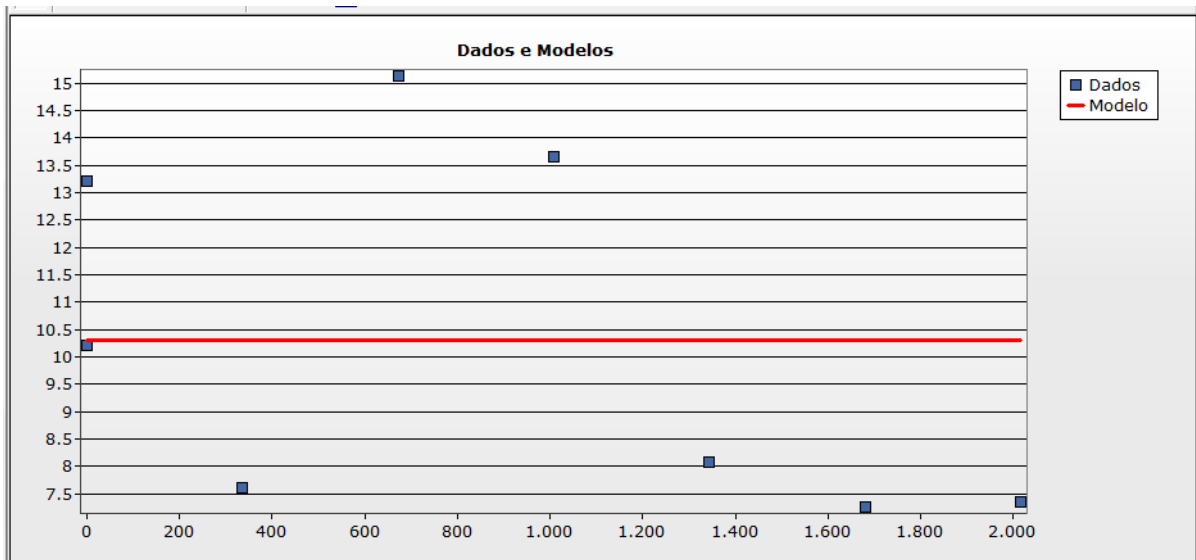


Figura 12 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Gompertz para *L. casei*.

Fonte: Autor.

Onde o eixo x é o tempo em horas de processamento e o eixo y a contagem em \log_{10} UFC/mL.

Fonte: Autor.

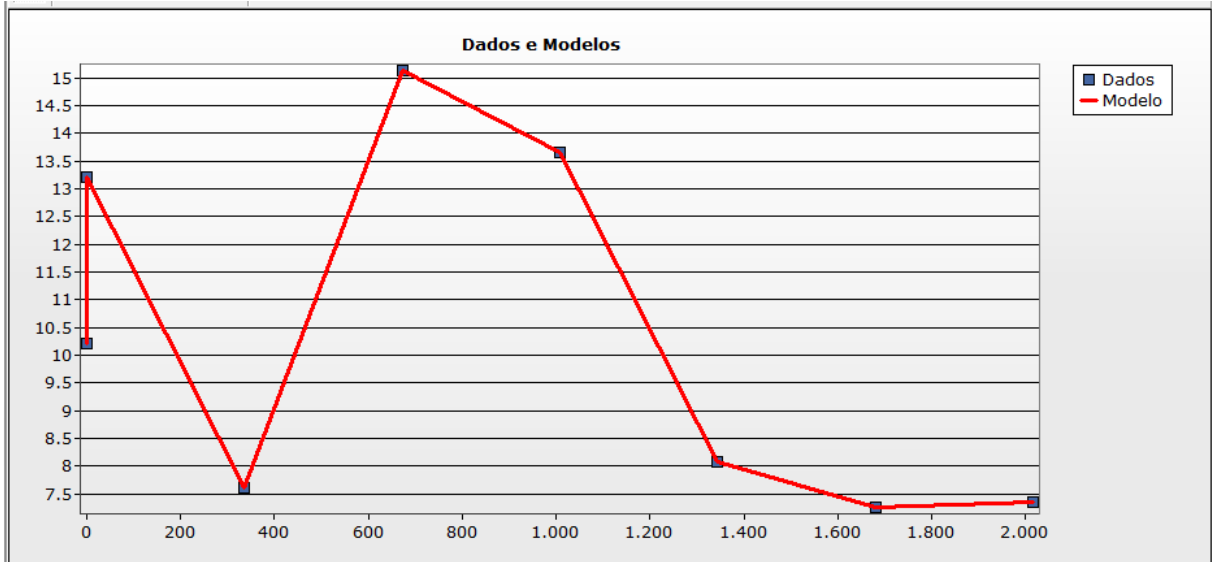


Figura 13 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Baranyi e Roberts para *L. casei*

Fonte: Autor.

Onde o eixo x é o tempo em horas de processamento e o eixo y a contagem em \log_{10} UFC/mL.

Para os ajustes feitos para as BAL a partir dos modelos propostos, os resultados das curvas estão apresentados nas figuras 10 e 11 para *L. paracasei* e 12 e 13 para *L. casei*, nos quais não foi possível observar um bom ajuste na fase *lag*, estacionária ou de declínio para o modelo de Gompertz para ambas as cepas probióticas, demonstrando que o modelo proposto não foi adequado nem eficiente para este crescimento microbiano. Os pontos mais dispersos ao longo do curso foram responsáveis por comprometerem a exatidão dos parâmetros do método e conseqüentemente seu ajuste matemático.

Para o modelo proposto de Baranyi e Roberts, os ajustes foram ideias para os tipos de cepas inoculadas no produto, visto que os mesmos se adequaram em todas as fases de crescimento de ambos os microrganismos, compreendendo uma diferença nas fases de crescimento entre os probióticos. Avaliando os comportamentos dos microrganismos, pode-se perceber que para o *L. paracasei* no tempo 0 antes da etapa de fermentação durante a produção, obteve uma queda na células viáveis até o tempo 0 após o período de maturação, as quais as fases dos probióticos seguiram um crescimento na fase *lag* até o tempo 672, seguido da fase estacionária que no tempo 1008 decaiu iniciando a fase de declínio. Na avaliação para o *L. casei*, notou-se um comportamento contrário no tempo 0 no momento da produção da massa dos embutidos, visto que as cepas iniciaram com menos células viáveis quando comparado ao tempo 0 depois da maturação, entretanto as outras etapas de desenvolvimento microbiano foram semelhantes ao *L. paracasei*, o qual iniciou sua fase *lag* a partir do tempo 200, fase estacionário no tempo 672 e fase de declínio no tempo 1008.

Diante do exposto, entende-se que o tempo de desenvolvimento para ambos os microrganismos foram os mesmos, com um período de fase *lag* que durou 336 horas, se mantendo ativos até o final do prazo de validade, porém com início da fase de declínio no tempo 1008, que corresponde aos primeiros 42 dias. Sendo assim, este prazo seria o ideal para o início do consumo destes embutidos fermentados para se obter de forma mais eficaz os benefícios que os probióticos inoculados oferecem.

De acordo com os valores das tabelas do modelo de Gompertz, os erros elevados em relação aos dados experimentais confirmam a não adequação do modelo de Gompertz ao crescimento dos dois probióticos adicionado aos embutidos fermentados, podendo ser justificado pela melhor aplicação destes modelos em outras espécies diferentes de microrganismos não necessariamente presente em alimentos, podendo também vir a gerar uma diminuição do valor do R^2 ao avaliar a validação matemática estatística. O contrário deve ocorrer com o modelo de Baranyi e Roberts, visto a excelente adequação do mesmo às cepas microbianas.

5.6. VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

Os valores obtidos a partir das equações apresentadas neste trabalho, foram ajustados a partir dos modelos primários de Baranyi e Roberts e Gompertz às curvas de crescimento microbiano dos probióticos *L. casei* e *L. paracasei* ao longo do tempo de 84 dias de estocagem dos embutidos fermentados, e estão dispostos na Tabelas 20 e 21.

Tabela 20 - Parâmetros de validação matemáticas dos modelos primários às curvas de crescimento do *L. casei* no período de armazenamento à temperatura de 4°C

| Modelo | Fator Bias | Fator Exatidão | RMSE | R^2 |
|-------------------|------------|----------------|-------|--------|
| Gompertz | 1,173 | 1,173 | 9,148 | -0,749 |
| Baranyi e Roberts | 1,128 | 1,128 | 0 | 1 |

Fonte: Autor.

Tabela 21 - Parâmetros de validação matemáticas dos modelos primários às curvas de crescimento do *L. paracasei* no período de armazenamento à temperatura de 4°C

| Modelo | Fator Bias | Fator Exatidão | RMSE | R^2 |
|-------------------|------------|----------------|-------|--------|
| Gompertz | 1,160 | 1,160 | 5,836 | -0,750 |
| Baranyi e Roberts | 1,128 | 1,128 | 0 | 1 |

Fonte: Autor.

Os valores dos índices estatísticos R^2 e RMSE, bem como os fatores bias e exatidão resultantes dos ajustes dos modelos de Gompertz e Baranyi e Roberts aos dados de crescimento microbiano de ambos probióticos durante o

tempo de vida de prateleira, totalizando 84 dias, estão apresentados nas tabelas 20 e 21. Os valores de R^2 próximos a 1 indicam melhor desempenho do modelo, bem como valores de RMSE próximos a 0 demonstram menor diferença entre valor observado (real) e predito pelos modelos matemáticos escolhidos, o que esclarece a adaptação dos mesmos (PERINI, 2014). Em relação ao fator de exatidão, no seu cálculo se trata de valores absolutos, por isso sempre serão maior que 1, entretanto, quanto maior seu valor, menor a exatidão estimativa da média, ou seja menos exato é o modelo (SILVA, 2013).

Analisando os dados dessas tabelas é possível verificar através dos índices estatísticos, principalmente pelo fator de exatidão e R^2 , os quais devem estar o mais próximo de 1 possível, bem como a partir do valor de RMSE que deve ser próximo a 0, que o modelo de Baranyi e Roberts apresentou melhor capacidade de ajuste para ambos probióticos aos valores experimentais quando comparado ao modelo de Gompertz para as mesmas condições de armazenamento e diluições aplicadas. Confirmando as análises feitas nos gráficos das curvas dos modelos obtidos anteriormente neste mesmo estudo.

Um dos principais fatores responsáveis pela interferência dos ajustes dos modelos matemáticos é a diminuição da população microbiana durante a fase *lag*, como mostram as equações desta pesquisa. No presente trabalho percebeu-se uma queda desse crescimento, quando se passa da fase *lag* para o início da fase de declínio, entretanto o modelo de Gompertz não descreve muito bem essa diminuição em sua função quando comparado ao modelo de Baranyi e Roberts, o que pode justificar o baixo ajuste do modelo de Gompertz aos dados experimentais. Além disto, a composição do alimento, condições ambientais, idade e estado das células no momento da inoculação, podem afetar o crescimento dos microrganismos, fazendo-o desviar-se do comportamento típico desejado, apresentando uma diminuição da fase *lag*, afetando no momento ao se ajustarem em modelos matemáticos (ANTWI, 2007).

Na literatura há relatos que um dado modelo pode ser mais apropriado que o outro para descrever a curva de crescimento de um microrganismo específico. Entretanto, o modelo BAR apresentou os menores desvios e

valores mais ajustados de R^2 e fator exatidão. Estudos revelam testes dos modelos de Baranyi e Roberts aos dados do crescimento de *L. viridescense* em presuntos, sendo que os mesmos mostraram que o modelo representou de forma adequada os dados experimentais, com resultados de R^2 e fator de exatidão próximos a 1 e valor de RMSE próximo a 0, sendo compatíveis com os resultados do presente estudo (SILVA, 2015).

Em geral, o modelo de Gompertz não se ajustou bem a nenhum dos dados de crescimento de *L. casei* e *L. paracasei* durante todo o tempo de vida de prateleira. Entretanto, observou-se um ajuste ideal quando se tratou do modelo de Baranyi e Robert, encontrando o R^2 com valor de 1, RMSE igual a 0 e fator de exatidão mais próximo a 1. Quando a quantidade disponível de dados do crescimento microbiano é menor e a fase *lag* é mais longa, observa-se que modelos com função de ajuste podem ser mais complexos em descrever esta curva de crescimento.

6. CONCLUSÃO

Os embutidos fermentados tipos salame de carne de ovino produzidos apresentaram características físico-químicas e físicas, de acordo com a legislação brasileira, caracterizando assim um embutido fermentado tipo salame com características adequadas para consumo, estando dentro dos padrões de identidade e qualidade. Em relação às análises de carboidrato e atividade de água os resultados não se mantiveram dentro dos padrões exigidos pela legislação, principalmente devido a formulação do produto e inoculação de *Lactobacillus*.

De acordo com os resultados microbiológicos, todos os ensaios apresentaram ausência de microrganismos de acordo com a legislação vigente, garantindo desta forma um alimento de qualidade e seguro para consumo, isento de contaminações que podem causar risco a saúde humana.

A contagem de BAL realizada durante o período de 84 dias demonstrou que os embutidos inoculados de probiótico *L. casei* e *L. paracasei*, apresentaram células viáveis na ordem de no mínimo 10^7 UFC/mL, atendendo desta forma o requisito da norma IN nº46/2007, para probiótico vivo e ativo, trazendo benefícios funcionais e ação bioconservadora para o produto alimentar.

A aplicação dos modelos matemáticos, Baranyi e Roberts e Gompertz, nos embutidos fermentados tipo salame de carne ovina mostraram um ajuste mais adequado para ambas as situações apenas para a função de Baranyi e Roberts, devido os fatores R^2 e fator exatidão se encontrarem mais próximos de 1, e RMSE igual a 0, garantindo o melhor ajuste e predição do modelo aos dados encontrados.

Com o elevado ajuste das BAL para o modelo matemático proposto de Baranyi e Roberts, pode-se concluir e garantir a viabilidade dos probióticos inoculados ativos por 84 dias nos embutidos fermentados, pois apresentaram valores acima de 10^7 UFC/mL, valor mínimo para promover benefício à saúde humana, conforme estabelece a legislação brasileira.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABULARACH, M.L.S; ROCHA, C.E.; FELÍCIO, P.E.de. Características de qualidade do controle do contrafilé (m. L. dorsi) de touros jovens da raça Nelore. Ciênc. Technol. Aliment. v.18, n.2, p.205-210, 1998.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília, 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. IX Lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas. Julho, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Regulamento Técnico sobre Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos. Brasília, 1998.

AGUILERA, J.M.; CHIFRE, F. Combined methods for the presevation of foods in Latin America and the CYTED D Project. Journal of Food Engineering. Essex, v.22, n. 1-4, p.433-444, 1994.

AMBALAM, P.; RAMAN, M.; PURAMA, R. K.; DOBLE, M. (2016). Probióticos, prebióticos e prevenção do câncer colorretal. Melhores Práticas e Pesquisa em Gastroenterologia Clínica, 30(1), 119-131.

ANASTÁCIO, A. Microbiologia Preditiva Alimentar: As sinergias entre a microbiologia, a matemática e as tecnologias da informação. Segurança e Qualidade alimentar [online], n.7, p.56-59, 2009.

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

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

APHA. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. Washington, 2005

ARROYO-LÓPEZ, F.N.; BAUTISTA-GALLEGO, J.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Role of predictive microbiology in food preservation. In: BHAT, R.; ALIAS, A.K.; PALIYATH, G. Progress in Food Preservation. 1. ed. Wiley-Blackwell, 10/01/2012. Capítulo 19. Wiley-Blackwell.

ASHAOLU, T. J. Safety and quality of bacterially fermented functional foods and beverages: a mini review. Food Quality and Safety, p. 1–5, 2020.

ASHRAF, R.; SHAH, N. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. International Journal of Food Microbiology, v. 149, n. 3, p. 194-208, 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. METHOD 991.14: Official methods of analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersburg: AOAC International, p. 2-22, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official Methods of Analysis. 18 th. ed. Gaithersburg, method: 978.18, 2005.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 2004. p.1-66.

AZEVEDO, M. M. R. et al. Mathematical models to estimate the cashew tree false fruit ruminal fermentation kinetic through the semi-automatic in vitro gas production technique. Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n. 9, p. 73534-73549 sep. 2020.

AZNAR, R.; ZUÑIGA, M. ¿Qué son las bacterias lácticas? Instituto de Agroquímica y Tecnología de alimentos, 1-8. 2017.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A dynamic approach to predicting bacterial-growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, n. 3-4, p. 277-294, 1994.

BARCELLOS, M. D. DE; LIONELLO, R. L. Consumer Market for Functional Foods in South Brazil. *International Journal Food System Dynamics*, v. 2, n. 2, p. 126–144, 2011.

BARBOSA, M. S. et al. Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v. 47, p. 147-153, 2015.

BASSANEZI, R.C. FERREIRA, JR.W.C. Ensino-aprendizagem com modelagem matemática: uma nova estratégia. São Paulo: Contexto, 2011.

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. Estimating the bacterial lag time: wich model, which precision. *Int. J. Food Microbiol.* [online], v. 91, n. 3, p. 261-77, 2004.

BAÚ, F. C. Fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do câncer gástrico e de esôfago. *Rev Contexto e Saúde* 2011;11:16-24.

BEM SLIMA, et al. (2018). Efeitos de cepas probióticas, *Lactobacillus plantarum* TN8 e *Pediococcus acidilactici*, nas características microbiológicas e físico-químicas de linguças bovinas. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 92, 195-203.

BENDALI, F., MADI, N., SADOON, D. Benefiial effects of a strain of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in *Staphylococcus aureus*-induced intestinal and colonic injury. *International Journal of Infectious Diseases*, 15, 787-794. 2011.

BENGOA, A. A. et al. Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food Microbiology*, v. 69, p. 212–218, 2018.

BENGOA, A. A. et al. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 126, n. 3, p. 686–700, 2019.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. *Nutrição de Ruminantes*. 2ed. Jaboticabal: FUNEP, 2011. 616p.

BERKEL, B.M.V.; BOOGAARD, B.V.D.; HEIJNEN, C. *Conservação de peixe e carne*. Wageningen, Países Baixos: Digigrafi, p.97. 2005.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; HENRI-DUBERNET, S; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, v. 126, p. 278-285. 2008.

BIASI, V. *Produção de salame tipo italiano através de cura natural com extratos de aipo e acelga*. 2010. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

BIASUZ, T. *Obtenção de espécies de Lactobacillus microencapsulado em carragena com combinação proteica e aplicação em salame tipo milano*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira/Campo Mourão, 2018.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, v. 31, n. 2, p. 118–129, 2013.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J.; *Can. J. Biochem. Physiol.* 911, 37, 1959.

BOURNE, M.C. Texture profile analysis. *Food Technology*. v. 32, n. 7, p. 62-72. 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília: Diário Oficial da União, jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em Julho de 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Instrução Normativa nº46. Diário Oficial da União, 23 de outubro de 2007. Brasília: Ministério da Agricultura, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº2 de 7 de janeiro de 2002. Cria o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticas Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais ou de Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília – DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de industrializados cárneos. Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000. Diário Oficial da União, Brasília, 05/04/2000, nº6, Seção I, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnicos de Identidade e Qualidade de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salaminho tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo Hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Lingüiça Colonial e Pepperoni. Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura de agropecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20. Regulamento técnico de identidade e qualidade do hambúrguer. Diário Oficial da União, DF, 3 ago. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura de Agropecuária e Abastecimento. Métodos analíticos para controle de produtos cárneos e seus Ingredientes - Métodos físico-químicos. Instrução Normativa nº 20 de 09 de setembro de 1999. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos. Brasília, 1993.

BULTOSA, G. Alimentos funcionais: fibras alimentares, prebióticos, probióticos e simbióticos. Dentro Enciclopédia de grãos alimentares: 2ª ed. (2ª edição, Vol. 2-4), 2015.

BURIN, P. C.; FUZIKAWA, I. H. S.; SOUZA, K. A.; FERNANDES, A. R. M.; GOES, R. H. T. B. Características nutracêuticas da carne e sua importância na alimentação humana. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, v. 17, n. 12, 2016.

BURITI, A. C. F.; SAAD, I. M. S. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. Arch Latin amer Nutr. 2007;57(4):373-80.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, n.44, p. 1-8, 2014.

CALDERÓN, O.; PADILLA, C.; CHAVES, C.; VILLALOBOS, L.; ARIAS, M. L. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Arch Latinoamer Nutric. 2007; 57 (1): 51-56.

CARDARELLI, H. R. Inulin and oligofrutose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. *LWT*, v.41, p. 1037-1046, 2008.

CAROLINA, F.; BURITI, A.; ISAY, M. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização , viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. v. 57, n. 10, 2007.

CARVALHO, C. C. P. Aplicação e viabilidade de microrganismos potencialmente probióticos em embutido cárneo fermentado. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”. Tese de doutorado Engenharia e Ciência de Alimentos. São José do Rio Preto. SP. Brasil. 2014.

CARVALHO, F. L. O.; UYEDA, M.; DEL BUONOM, H. C.; GONZAGA, M. F. Probióticos e prebióticos: Benefícios acerca da literatura. *Revista de Saúde. ReAGES*, 1(1), 58-87. 2017.

CARVALHO, L. M. C. P. Q. Identificação e caracterização de Isolados de *Staphylococcus*: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados secos e fumados. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2010.

CARVALHO M. Isolamento e caracterização de bacteriocinas com potencial interesse na área alimentar. Dissertação (Mestrado) – Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal. 2015.

CASABURI, A. et al. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. *Meat Sci.*, v. 71, p. 643-650, 2005.

CASSOL, N. Desenvolvimento de embutido fermentado caprino utilizando carnes de animais de descarte com e sem uso de culturas starters. *Tecnologia em alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR*, Francisco Beltrão. 2018.

CASTRO, J. M. et al. Review Article Biocheese: A food probiotic Carrier, *BioMed Research International*, 11 pages, 2015.

CEPEDA, J. F. et al. Heat and Mass Transfer Modeling for Microbial Food Safety Applications in the Meat Industry: A Review. *Food Engineering Reviews*, v. 5, n. 2, p. 57–76. 2013.

CHAVES, A. A. M. Avaliação da suscetibilidade a antibióticos de *Lactobacillus plantarum* isolados de produtos de salsicharia tradicional portuguesa. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal. 2013.

CHIANG, S.; PAN, T. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* NTU 101 and its fermented products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, p. 903–916, 2012.

CICHOSKI; A. J. Desenvolvimento de paleta suína curada maturada e fermentada com adição de *Staphylococcus xylosum*. Curitiba, 2004. Tese (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná.

CHEN, X.; MI, R.; QI, B.; XIONG, S.; LI, J.; QU, C.; QIAO, X.; CHEN, W.; WANG, S. Effect of proteolytic starter culture isolated from Chinese Dong fermented pork (Nanx Wudl) on microbiological, biochemical and organoleptic attributes in dry fermented sausages. *Food Science and Human Wellness*. 2020.

CHOWDHURY, B. R.; CHAKRABORTY, R.; CHAUDURI, U. R. Validaty of modified Gompertz and Logistic models in predicting cell growth of *Pediococcus acidilactici* H during the production of bacteriocin pediocin Ach. *Jounal of Food Engeneering*, v.80 (4), p. 1171-1174, 2007.

CIROLINI, A. F., LEADIR, L. M., TERRA, N. N., MILANI, L. I. G., URNAU, D., SANTOS, B. A., CERVA, G. D., REZER, A. P. S. Salame tipo italiano elaborado com culturas starters nativas. *Food Sci. Technol.* 2010; 30: 171-179.

COELHO, F.J.O.; QUEVEDO, P.S.; MENIN, A.; TIMM, C.D. Avaliação do prazo de validade do iogurte. *Goiânia, Ciência Animal Brasileira*. v.10, n.4, p.1155-1160, 2009.

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

COSTA, A. C. C. C. Isolamento de Bactérias Lácticas Produtoras de Bacteriocinas e Avaliação de sua Atividade Frente a Patógenos Alimentares em Sistema de Bioconservação de Produto Lácteo. Dissertação (Mestrado) - Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás. 68 p. Goiânia, 2016.

CRUZ, A. G., OLIVEIRA, C., CORASSIN, C. H., SÁ, P. Processamento de produtos lácteos: Queijos, Leites Fermentados, Bebidas Lácteas, Sorvete, Manteiga, Creme de Leite, Soro em Pó e Lácteos Funcionais. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

DANNENHAUER, C.E. Desenvolvimento de um Aplicativo Computacional para Microbiologia Preditiva. Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, SC. Dissertação: Mestrado. 2010. 73 f.

DE CARVALHO, C. C. P. et al. Produção de embutido cárneo fermentado por *E. faecium* como cultura starter: Caracterização físico-química e microbiológica, aceitação sensorial e viabilidade celular. *Acta Scientiarum - Technology*, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 395–402, 2017.

DE MARTINS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. *Biotechnology ciência e Desenvolvimento*, v.29, p.114-119, 2003.

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

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

DI CERBO, A.; PALMIERI, B. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* f19; A farmacogenomic and clinical update. *Nutricion Hospitalaria*, v. 28, n. 6, p. 1842–1850, 2013.

DÍAZ, L. D.; FERNÁNDEZ-RUIZ, V.; CÁMARA, M. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 60, n. 10, p. 1738–1746, 2020.

DIMITRELLOU, D. et al. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. *LWT - Food Science and Technology*, v. 71, p. 169–174, set. 2016.

DUBEY, V.; GHOSH, A. R.; BISHAYEE, K.; KHUDA-BUKSH, A. R. (2016). Avaliação do Potencial anticancerígeno do probiótico *Pediococcus pentosaceus* GS4 contra o câncer de cólon: abordagens in vitro e in vivo. *Jornal de Alimentos Funcionais*, 23, 66-79.

DUTCOSKY, S. D. *Análise sensorial de alimentos*. 2 ed. ver e ampl. Curitiba: Champagnat, 2017. 239 p. 2010.

ERTÜRKMEN, Pelin et al. Utilização de bactérias lácticas e probióticos em produtos cárneos. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, v. 15, p. 78-82, 2016.

ESTURRARI, E. F. *Oferta e demanda do mercado de ovinos de corte: um panorama nacional de perspectivas, tendências e oportunidades*. 2017. 31 f. Mestrado (Administração de Negócios; MBA em Gestão do Agronegócio) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FAKRUDDIN, M.; MAZUMDER, R.M.; MANNAN, K.S.B. Predictive microbiology: modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science*, v.40, n.2, p.121-131, 2011.

FEINER, G. Carne e gordura. Salame: ciência prática e tecnologia de processamento. 2016.

FERNANDES, E. N. et al. Enumeração e atividade antagonista de bactérias ácido lácticas isoladas de iogurtes brasileiros. *Revista Científica Univiçosa*, Viçosa, v.7, 2015.

FERRÃO, S. P. B. Características morfométricas, sensoriais e qualitativas da carne de cordeiros. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

FERREIRA, C. L. L. F. Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção. Rio de Janeiro - RJ. Editora: Rubio, 2012.

FERREIRA, C. L. L. F. Produtos Lácteos Fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: UFV, 2005, 112p.

FIEIRA, C. Interferência de diferentes sais sobre a cultura starter de salame tipo italiano. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Francisco Beltrão, 2014.

FORSYTH E , S. J.; HAYES, P.R. Food hygiene, microbiology and HACCP. 3. ed, USA: Microbiologia da Segurança dos Alimentos . 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 2, p. 82-142.

FREITAS, E. R.; RABELLO, C. B.; WATANABE, P. H. Probióticos e Prebióticos na Nutrição de Monogástricos. In: Sakomura, N.K., et al. (org.) Nutrição de Não Ruminantes. Jaboticabal: Funep, 2014.p. 485-510.

FELDMAN, V. Avaliação de linhagens de bacterianas obridas a partir de kefir como cultura iniciadora para produção de embutido cárneo fermentado. Dissertação do mestrado em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte – MG. 2015.

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.

GARCÍA-CEJA, A.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *LWT - Food Science and Technology*, v. 63, n. 1, p. 482-489, set. 2015.

GARCIA, I. F. F.; LEOPOLDINO JUNIOR, I. Influencia do manejo produtivo na qualidade da carne caprina e ovina. Programa de Pós-Graduação – DZO – Universidade Federal de Lavras. 2018.

GASPAR, P. et al. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 6, p.764-788, 2013.

GIBSON, A. et al. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.23, n. 3-4, p.419-431, Nov. 1994.

GEITENES, S. et al. Modelagem do crescimento de bactérias lácticas e análise microbiológica em apresuntado e presunto cozido e embalado a vácuo. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, 15, 113- 133, 2013.

GOLDSTEIN, E. J. C.; TYRRELI, K. L.; CILTRON, D. M. *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60, S98-S107. 2015.

GOMES, B. O. Aplicação e viabilidade de probiótico (*Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*) microencapsulado em embutido fermentado tipo salame. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, 2020.

GOMES, B. O.; OLIVEIRA, C. M.; MARINS, A. R.; COUTINHO, F. H.; GOMES, R. G.; FEIHRMANN, A. C. Aplicação do probiótico *Bifidobacterium animalis*

spp. Lactis-BB12 em embutido cárneo fermentado tipo salame. 7º Simpósio de Segurança Alimentar. SBCTA – RS. 2020.

GOMPERTZ, B. On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life, 1825. Trans. R. Soc. 115, 513-585.

GOVENDER, M. et al. A review of the advancements in probiotic delivery: Convencional 3vs. Non-convencional formulations for intestinal flora supplementation. AAPS Pharmaceutic Science and Techology, v. 15 (1), p. 29-43, 2014.

GRANADOS C et al. Análisis proximal, sensorial y de textura de salchichas elaboradas con subproductos de la industria procesadora de atún (*Scombridae thunnus*). Información Tecnológica 24: 29-34. 2013.

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.

HILL, DARAGH, SUGRUE, IVANTOBIN, CONOR et al. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

HLEAP JI & VELASCO AV. Análisis de las propiedades de textura durante el almacenamiento de salchichas elaboradas a partir de Tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias* 8: 46-56. 2010.

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.

HORITA CN et al. 2011. Physico-chemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. *Meat Science* 89: 426-433.

HUANG, L. A comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, v.171, p.100-107, 2014.

HUANG, S.; CAUTY, C.; DOLIVET, A.; LE LOIR, Y.; CHEN, X. D.; SCHUK, P.; JAN, G.; JEANTET, R. Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. *Journal of Functional Foods*, 23, 453-463. 2016.

HUGO, A. A.; BRUNO, F.; GOLOWYCZYC, M. A. Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie*. 69, 185-190. 2016.

INÔ, M. M. O., et al. Interference of starter cultures in the chemical and physicochemical parameters during the processing stages of Italian type salami. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.7, n.2, p. 14153-14170 feb. 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 832.

KALSCHNE, D. L. et al. Growth Inhibition of Lactic Acid Bacteria in Ham by Nisin: A Model Approach. *Meat Science*, 98, 744–752, 2014.

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.

KNAPIK, A., TEICHRIB, M., NESELLO, M., LOPES, W., MATTANNA, P. Desenvolvimento de salame probiótico fermentado com microcápsulas contendo *Lactobacillus paracasei paracasei*. *Revista Eletrônica Biotecnologia e Saúde*, Curitiba, n. 18, maio-ago. 2017.

KWON, D. L. Scientific knowledge in traditional fermented foods. *Journal of Ethnic Foods*, 5(3), 153-154. 2018.

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

LI, X.Y.; CHEN, X.G.; SUN, Z.W.; PARK, H.J.; CHA, D.S. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, v. 8, n. 4, p. 1479–1485. 2013.

LIMA, I. A. Elaboração e caracterização de salame de cordeiro Santa Inês. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Itapetinga. Bahia. 2009.

LIMA, I. A.; SANTOS-CRUZ, C. L.; CAVENAGHI, Â.D; CRUZ, C. A. C.; LIMA, T. R. Elaboração de salame de cordeiro tipo italiano. *Revista Nacional da Carne*, v.418, p. 54-63, 2011.

LIMA JÚNIOR, L. C. “Alimentação saudável e exercícios físicos em meio à pandemia da COVID-19”. *Boletim de Conjuntura (BOCA)*, vol. 3, n. 9, 2020.

LONGHI, D. A.; CARFIOCI, B. A. M.; LAURINDO, J. B.; ARAGÃO, G. M. F. D. Modeling the growth of *Byssochlamys fulva* on solidified apple juice at different temperatures. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(6), 971-978, 2014.

LONGHI, D. A. Delineamento experimental ótimo para a estimativa dos parâmetros do crescimento de *Weissella viridescens* em condições não-isotérmicas. 2016. 133p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

LYOCARNI – Culturas para aplicações em carne. Campinas: Sacco Brasil, 2013.

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER Jr. S. B.; TERRA. N. N.; FREITAS, R. J. S. Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, jul.-set. 2008.

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

MAFRA, J. F. et al. Probiotic characterization of a commercial starter culture used in the fermentation of sausages. *Food Science and Technology*, n. AHEAD, 2020.

MANUEL, A. J. A. Novo produto transformado- Caracterização físico química de pernas curadas de carne ovina e caprina. Instituto Politécnico de Bragança, 2014.

MAPA/SDA/CGAL. Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV. Código da metodologia: MET POA/SLAV/13/04/03. Julho, 2014. p. 1-7.

McMEEKIN, T. A., ROSS, T. Predictive microbiology: providing a know ledge-based framework or change management. *International Journal os Food Microbiology*, v.78, p. 133-153, 2002.

MELO, T. A.; RIBEIRO, A, M. A.; LAVINAS, F. C.; ALMEIDA, R, I. Levantamento e caracterização dos produtos probióticos disponíveis no mercado varejista da região metropolitana do Rio de Janeiro. *Revista Rede de Cuidados em Saúde*, 10(1), 1-3. 2016.

MENDES, A. C. G.; RETTORE, D. M.; RAMOS, A. de L. S.; CUNHA, S. de F. V. da; OLIVEIRA, L. C. de; RAMOS, E. M. Salames tipo Milano elaborados com fibras de subprodutos da produção de vinho tinto. *Ciência Rural*, v. 44, n. 7, p. 1291-1296, 2014.

MESSAOUDI, S. et. al. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 296-304, 2013.

MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO, EXTERIOR E SERVIÇOS – MDCI. Ministério da Economia. Disponível em < <http://www.mdic.gov.br/index.php>>, acessado em 01 de dezembro de 2020.

MONFORT, J. M. Los productos carnicos crudos curados. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (2002: Porto Alegre). Anais. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p. 3984-3992.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. *J. Pediatr.*, v. 82, n. 5, 2006.

MORENO, G. M. B.; LIMA JÚNIOR, D. M.; SOUZA, N. O. B.; CIRNE, L. G.; NETO, O. B.; SOUZA, S. F. Qualidade da carne de cordeiros: genótipo e manejo nutricional. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 19, n. 3, p. 118-129, 2016.

MOTARJEMI, Y. Impact of a small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, v. 75, p. 213-229, 2002.

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

NIKBAKHT, E. et al. Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. *European Journal of Nutrition*, v. 57, n. 1, p. 95-106, 2016.

NOGUEIRA FILHO, A. et al. Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos no Nordeste. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2010. 128p. (Série Documentos do ETENE n. 27).

NOGUEIRA, J.C.R; GONÇALVES, M.C.R. Probióticos-Revisão da Literatura. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 15, n. 4, p. 487-492, 2011.

NOVAK, R. F.; ALMEIDA, G. A. J.; VIEIRA, O. G.; BORBA, M. L. Colostró humano: fonte natural de probióticos. *J Pediatr.* 2001; 77(4):265-70.

NUNES, A. S. et al. Modeling the growth of salmonella spp. In broiler meat stored at different temperature conditions. *Brazilian Journal of Development, Curitiba*, v.7, n.9, p. 91163-91175 sep. 2021.

OLIVEIRA, G. L. et al. Salames elaborados com a utilização de kefir como cultura iniciadora: aceitação sensorial e mapa de preferéncia interno. *Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente – Vol. 2 – N. 1.* 2021.

OLIVEIRA, M. E. G.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, C. E. V.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; MADUREIRA, A. R. M. F.; CONCEIÇÃO, M. L.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. *Food Research International*, v. 64, p. 241-247, 2014.

OSÓRIO, J.C.S.; OSÓRIO, M.T.M. & SAÑUDO, C. Características sensoriais da carne ovina. *Revista Brasileira de Zootecnia*, (supl. especial), v.38, p.292-300, 2009.

PEHRSON, M. E. de S. F. Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* sp. que apresentam propriedades probióticas. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PÉREZ- RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A. *Predictive microbiology in foods.* Córdoba: Springer, 2013. 132 p.

PERINI, F. O. Avaliação da multiplicação de *Bacillus thuringiensis* no leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva. Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto alegre. 2014.

PINHEIRO, A. C.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A. Nanotecnologia como ferramenta para produzir novos alimentos funcionais: vantagens e

precauções. TecnoHospital, Revista de Engenharia e Gestão da Saúde, v. 59, p. 22-25, 2013.

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; HEINEMANN, R. J. B. Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos – uma revisão. Boletim do SBCTA, v. 35, n. 1-2, p. 109- 116, 2001.

PISACANE, V.; CALLEGARI, M. L.; PUGLISI, E.; DALLOLIO, G.; REBECCHI, A. Microbial analyses of traditional Italian salami reveal microorganisms transfer from the natural casing to the meat matrix. *Int. J. Food Microbiol.* 2015; 207: 57–65.

PITHVA, Sheetal et al. Potential of probiotic *Lactobacillus* strains as food additives. INTECH Open Access Publisher, 2012.

PRADO, N.; SAMPAYO, M.; GONZÁLEX, P.; LOMBÓ, F.; DIÁZ, J. Physicochemical, sensory and microbiological characterization of Asturian Chorizo, a traditional fermented sausage manufactured in Northern Spain. *Meat Sci* 156:118–124. 2019.

PRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool. *Trends Food Science and Technology*, 48, 27-39. 2016.

PROVEDA, J. M., CHICÓN, R., CABEZAS, L. Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starts. *International Dairy Journal*, 47, 94-101. 2015.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; REIS FILHO, A.D. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Revista Ciência & Saúde*, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.

RANADHEERA, C. et al. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food research international*, v. 49, n. 2, p. 619-625. 2012.

RAMÍREZ, J. C. R.; ULLOA, P. R.; GONZÁLEZ, M. Y. V.; ULLOA, J. A.; ROMERO, F. A. Bacterias lácticas: Importancia em alimentos y sus efectos em la salud. Revista Fuente Año 2, n. 7, 2011.

RDSELOND, M. N.; ALMEODA, J. F.; CSZENTOND, O. C.; CANAAN, J. M. M.; PONTD, R. A.; VALDEZ, G. F.; RDSSO, E. A.; CAVALLONO, D. C. U. Salame probiótico com redução de gordura e sais de cura: físico-químico, características texturais e sensoriais. Ciência Alimentar. Technol, Campinas, 38 (2): 193-202, abril-junho de 2018.

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.

REALE, A. et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. LWT - Food Science and Technology, v. 60, n. 2, 721-728. 2015.

REINERT. Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhea. 2000.

ROBAZZA, W. S. Modelagem Matemática do Crescimento de Microrganismos em Alimentos. Universidade Estadual de Santa Catarina, 2010.

ROSELINO, M. N. Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Tese de doutorado em Alimentos e Nutrição. Araraquara. 2016.

ROSS, T. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. Journal of Applied Bacteriology, n. 81, v.5, p. 501-508, 1996.

RUBIO, R., AYMERICH, T., BOVER-CID, S., GUÀRDIA, M.D., ARNAU, J., GARRIGA, M. Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299 V and *Lactobacillus*

rhamnosus GG as starter cultures for fermented sausages. *LWT - Food Science and Technology*, v.54, 51–56, 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 livres e microencapsulada em salame tipo italiano. 2011. 125p. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo.

SAAD, N. et al. No overview of the last advances in probiotic and prebiotic Field. *LWT – Food Science and Technology*, v. 50 (1), p. 1-16, 2013.

SADE, E. *Leuconostoc* Spoilage of Refrigerated, packaged foods. Dissertação (mestrado). Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland. 2011.

SALMINEM, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHND, A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and functional aspects*. 3 ed, revised and expanded. Marcel Dekker, Inc. New York, 2004.

SÁNCHEZ, Ó.; BARRAGÁN, P.; SERNA, L. Review of *Lactobacillus* in the food industry and their culture media. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 21, n. 2, p. 63-76, 2019.

SANTA, O. R. D., MACEDO, R. E. F., SANTA, H. S. D., ZANETTE, C. M., FREITAS, R. J. S, TERRA, N. N. Use of starter cultures isolated from native microbiota of artisanal sausage in the production of Italian sausage. *Food Science and Technology*, v.34, n.4, p.780-786, 2014.

SANTA, O. R. D., MACEDO, R. E. F. D., SANTA, H. S. D., ZANETTE, C. M., FREITAS, R. J. S. D., & TERRA, N. N. Use of starter cultures isolated from native microbiota of artisanal sausage in the production of Italian sausage. *Food Science and Technology*, v. 34, n. 4, p. 780-786, 2014.

SANTOS JUNIOR, L. C. O., et al. Composição Centesimal, atividade de água e pH de carne de ovinos de descarte. V Simpósio de alimentos. Passo Fundos. RS. 2007.

SANTOS, M. M.; SANTOS, O, L. P.; CARVALHO, F. C.; GONZALEZ, F. G. Efeitos funcionais dos probióticos com ênfase na atuação do kefir no tratamento da disbiose intestinal. UNILUS Ensino e Pesquisa, 14(37), 144-156. 2018.

SAÑUDO, C., MUELA, E. & CAMPO, M. M. Key factors involved in lamb quality from farm to fork in europe. Journal of Integrative Agriculture. 12: 1919-1930. 2013.

SARMENTO, C.M.P. Modelagem do Crescimento Microbiano e Avaliação Sensorial no estudo da Vida de Prateleira de mortadela e linguiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

SARMENTO, C. M. P.; KALSCHNE, D. L; OLIVEIRA, M. F. B.; GEITENES, S. Modelagem do Crescimento de Bactérias Lácticas e Análise Microbiológica em Apresuntado e PresuntoCozido Fatiados e Embalados a Vácuo. Revista Ciências Exatas e Naturais, Vol.15, nº1, Jan/jun., 2013.

SAVOLDI, D. C. et al. Physical and sensory characteristics of Italian-Type Salami with propolis addition. Revista de Ciências Agroveterinárias 18 (2): 2019.

SAUCEDO-REYES, D.; MARCO-CELDRÁN, A.; PINA-PÉREZ, M. C.; RODRIGO, D.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, A. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cell. Innovative Food Science and Emerging Technologies, v. 10, p. 135-141, 2009.

SCARIOT, M. C. *Lactobacillus paracasei* em iogurte artesanal: monitoramento da viabilidade celular e capacidade de biocontrole contra os principais microrganismos patógenos de origem alimentar. Tese de doutorado em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2020.

SCHLEI, K. P. et al. Microbiologia preditiva: aspectos gerais e tendências. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, v. 10, p. 52-68, 2018.

SEBRANEK, J. G.; BACUS, J. N. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Sci.*, v. 77, p. 136-147, 2007.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, Oxford, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. *International Journal of Microbiology*, v. 2014. 2014.

SHOKRYAZDAN, P. et al. Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 36, n. 8, p. 666–676, 2017.

SIDIRA, M.; KANDYLIS, P.; KANELAKI, M.; KOURKOUTAS, Y. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages. *Food Chemistry*, 178, 201-207. 2015.

SILVA, C. N. Estudo da vida útil de linguiça frescal de frango e modelagem do crescimento de bactérias ácido lácticas em condições isotérmicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2013.

SILVA, N. Contagem de Bactérias Lácticas. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ed. São Paulo: Varela, 2007. cap. 14, p.183-189.

SILVA, N. B. Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto fatiado embalado à vácuo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2015.

SILVA, S. F. Avaliação de sistemas de embalagem na estabilidade do queijo Minas Frescal probiótico e na viabilidade da *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Tese de doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2016.

SIQUERIA, A. A.; CARVALHO, P. G. S.; MENDES, M. L. M.; SHIOSAKI, R. K. MicroFit: um software gratuito para desenvolvimento e ajuste de modelos matemáticos de crescimento bacteriano. Brazilian journal of food technology. V. 17, n. 4, p. 329-339, out/dez. 2014.

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

SIRINI, N.; ROLDAN, A.; GONZALEZ, R. L.; LOPES, J. F.; MATUS, M. V.; ALVARES, J. A. P.; FRIZZ, L. S.; ROSMINI, S. R. Efeito da farinha de castanha e microrganismo probiótico na funcionalidade de embutidos de carne seca. LWT – Ciencia e tecnologia de alimentos, 134. Elsevier. 2020.

SLONGO, A. P. et al. Modeling growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. LWT- Food Science and Technology, 42, 303-306, 2009.

SONG, M. Y., HOA, V. B., PARK, W. S., YOO, J. Y., KANG, H. B., KIM, J.H., KANG, S. M., KIM, B. M., OH M. H, HAM J. S. Quality characteristics of functional fermented sausages added with encapsulated probiotic bifidobacterium longum KACC 91563. Korean J. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, v. 38(5), p. 981-994, 2018.

SOUZA, B. V. C.; ROCHA, P. O.; BRITO, C. A. R. S.; GALVÃO, L. M. V.; NUNES, L. C. C. Scientific and technological prospection on microencapsulation of probiotics by spray drying. Revista GEINTEC-Gestão. Inovação e Tecnologias, 9(2), 4919-4928. 2019.

SOUZA, T. D. S.; YUHARA, T. T.; CASTRO – GÓMES, R. J. H.; GARCIA, S. Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas: otimização do meio de cultura. Brazilian Journal of food Technology, v. 10, n. 1, p. 27-34, 2007

STOLBERG, J.; VIOTT, A.; PELISSER, M. R. Qualidade microbiológica e físico-química de salames tipo coloniais da região do Alto Uruguai catarinense. Higiene Alimentar v.20, n.138, p.78-82, 2006.

SUBRAMANIAM, P; WAREING, P. *The Stability and Shelf Life of Food*. 2. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016. 612 p.

TABANDEH, F. et al. Fed-batch fermentation of *Bacillus clausii* for efficient production of alkaline protease using different feeding strategies. *Chemical Engineering Communications*, v. 198, n. 9, p. 1063–1074, 2011.

TABANELLI, G., COLORETTI, F., CHIAVARI, C., GRAZIA, L.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Effects of starter cultures and fermentation climate on the properties of two types of typical Italian dry fermented sausages produced under industrial conditions. *Food Control*. 2012; 26: 416-426.

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – 4^o edição revisada. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2011.

TAMANG, J. P. Biochemical and modern identification techniques. *Microfloras of Fermented Foods*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1, 250- 258. 2014.

TERPOU, A. et al. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. *Nutrients*, v. 11, n.7, p. 32, 2019

THOMÉ, B. R.; PEREIRA, M. G.; TOGNON, F. A. B.; MASSAROLLO, M. D.; FOLLADOR, F. A. C. Avaliação físico-química e microbiológica de salame tipo italiano. Congresso Brasileiro de Engenharia Química – COBEQ. Florianópolis, SC. 2014.

TOMPKIN, R. B. Nitrite. In: DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRANEN, A. L. (Ed.) *Antimicrobials in food*. 3rd ed. Boca Raton: CRC, 2005. p. 169-236.

TUFARELLI, V.; LAUDADIO, V. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. An overview on the functional food concept: perspectives and applied researches in probiotics, prebiotics and synbiotics. AN OVERVIEW ON THE FUNCTIONAL FOOD CONCEPT : PROSPECTIVES AND APPLIED RESEARCHES IN PROBIOTICS. v. 4, n. 2320, 2016.

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

VAN IMPE, J. F.; VERCAMMEN, D.; VAN DERLINDEN, E. Developing next generation predictive models: a systems biology approach. In: TAOUKIS, et al. 11 th International Congresso n Engineering and Food, Atenas, Grécia, p. 465-466, 2011.

VASCONCELOS, A. C. M. Modelagem determinística do crescimento de *Bacillus cereus* em função do pH e temperatura. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2017.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, v.100, n.7, p. 714-728, 2008.

VÁSQUEZ, A.; MOLIM G.; PETTERSSON B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. *Syst Appl Microbiol*. 2005; 28 (5): 430-441.

VEDOVATTO, E., STEFFENS, C., CANSIAN, R. L., BACKES, G. T., & VERLINDO, R. Avaliação de diferentes culturas starters na elaboração de salame tipo italiano. *Ciência Animal Brasileira*, v. 20, 2019.

VIANA, J. G. A.; MORAES, M. R. E. de; DORNELES, J. P. Dinâmica das importações de carne ovina no Brasil: análise dos componentes temporais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 3, p. 2223-2234, 2015. supl. 1.

VIDAL, A. M.; DIAS, D. O.; MARTINS, E. S. M.; OLIVEIRA, R. S.; NASCIMENTO, R. M. S.; CORREIA, M. G. S. "A ingestão de Alimentos Funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças". *Cadernos de Graduação Ciências Biológicas e da Saúde*, vol. 1, n. 15, 2011.

VIEGAS, R. P.; SOUZA M. R.; FIGUEIREDO, T. C.; RESENDE, M. F. S.; PENHA, C. F. A. M. CERQUEIRA, M. M. O. P. Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo

coalho. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia – Revista Científica, v.62, n.2, p.460-467, 2010.

VITAL, A. C. P.; GUERRERO, A.; KEMPINSKI, E. M. B.C.; MONTESCHIO, J; O.; SARY, C.; RAMOS, T. R.; CAMPO, M. M.; PRADO, I. N. Consumer profile and acceptability of cooked beef steaks with edible and active coating containing oregano and rosemary essential oils. Meat Science. p. 153-158, 2018.

WARD, R. E et al. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by Bifidobacterium infantis and Lactobacillus gassier. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 72, n. 6, p. 4497-4499, 2006.

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.

USDA. Overview of predictive microbiology. Predictive Microbiology Information Portal, 2016.

XU, M.; GAGNÉ-BOURQUE, F.; DUMONT, M.J.; JABAJI, S. Encapsulation of Lactobacillus casei ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. Journal of Food Engineering, v.168, p. 52–59. 2016.

YAO, M.; XIE, J.; DU, H.; MC CLEMENTES, D. J.; XIAO, H.; Li, L. Progresso em microencapsulação de probióticos: uma revisão. Revisões abrangentes em ciência de alimentos e segurança alimentar, 19(2), 857-874. 2020.

ZACARIAS M. F. et al. Preliminary Technological and potential probiotic characterization of bifidobacteria isolated from breast Milk for use in dairy products. International dairy journal, v.21, n.8, p. 548-555, 2011.

ZEOLA, N. M. B., SILVA, A. G. S., GONZAGA NETO, MARQUES, C. A. T. S. Composição centesimal da carne de cordeiros submetidos a dietas com diferentes teores de concentrado. Ciencia Rural, 34: 253-257. 2004.

ZHOU, K.; CUI, T. T.; LI, P. L.; LIANG, N. J.; LIU, S. C.; MA, C. W.; PENG, Z, H. Modelling and predictive the effect of temperature, water activity and ph on growth of *Streptococcus iniae* in Tilapia. *Journal of Applied Microbiology*, v.105, p. 1956-1965, 2008.

ZHOU, K.; Gui, M.; Li, P.; Xing, S.; Cui, T.; Peng, Z. Effect of combined function of temperature and water activity on the growth of *Vibrio harveyi*. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1365- 1375, 2012.

ZIMMERMANN, M.; MIORELLI, S. MASSEGUER, P. R.; ARAGÃO, G. M. F. Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fisheri* in pineapple juic. *LWT – Food Science and Technology*, v.44, p. 239-243, 2011.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 1875-1881, 1990.