UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DO CONSUMO
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 EMBUTIDO FERMENTADO "TIPO SALAME" DE OVINO

NATÁLIA MARTINS DOS SANTOS DO VALE

Recife

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 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.

Orientadora: Profª Drª Michelle Rayssa Pereira de Melo

Co-orientadora: Profª Drª 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 tiposalame 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 emCiência e Tecnologia de Alimentos, Recife, 2022.

1. produto cárneo. 2. bactérias ácido-lácticas. 3. modelagem preditiva.. I. Melo, Michelle Rayssa Pereirade, orient. II. Guerra, Jenyffer Medeiros Campos, coorient. III. Título

CDD 664

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 EMBUTIDO FERMENTADO "TIPO SALAME" DE OVINO

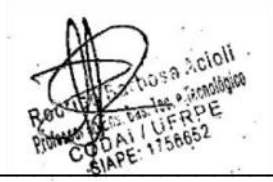
Por Natália Martins dos Santos do Vale

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 24/02/22 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

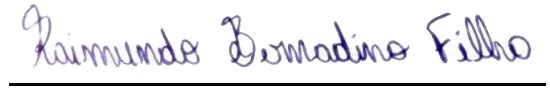
Presidente Profa. Dra. Erilane de Castro Lima Machado

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 potencialmente probiótica, pois apresentam compostos benéficos à saúde, sendo considerados funcionais. O objetivo do trabalho foi elaborar três embutidos fermentados tipo salame de carne ovina, um sem inoculação de cepas potencialmente probióticas, outro contendo *Lactobacillus casei* e o último com *Lactobacillus paracasei*, acompanhar e analisar as características físico-químicas, microbiológicas, bem como avaliar pela microbiologia preditiva de dois modelos matemáticos, o crescimento com células ativas dos microrganismos até o fim da vida útil. Os Ensaios S1 (sem probióticos), S2 (com *L. casei*) e S3 (com *L. paracasei*) foram produzidos com pernil de cordeiro, toucinho, ingredientes e aditivos, maturados em estufa com temperatura e umidade controladas por 30 dias, mantendo-se armazenados a 4ºC por até 84 dias. Foram realizadas análises físico-químicas de pH, acidez titulável, composição centesimal, análises físicas de textura e cor. Os ensaios microbiológicos foram realizados segundo às exigências da legislação, bem como a contagem das bactérias ácido-lácticas (BAL) analisadas por técnica *pour plate* em incubadora a 36°C por 48 horas. 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 físico-químicos, físicos e microbiológicos obtidos dos Ensaios S1, S2 e S3, estavam com valores dentro dos padrões vigentes pela legislação, demonstrando Boas Práticas de Fabricação (BPF) e armazenamento adequado. A contagem de BAL foi realizada durante 84 dias, no qual os embutidos fermentados apresentaram ao fim deste prazo valores acima de 10^7 UFC/g, suficientes para apresentar atividade potencialmente probiótica segundo a legislação. A aplicação dos modelos matemáticos propostos na metodologia preditiva mostrou-se eficiente apenas para o modelo BAR nos dois embutidos fermentados, apresentando as curvas das BAL ajustável e aplicável para o mesmo. Diante da adequação do modelo, resultados das análises físico-químicas e microbiológicas, pode-se garantir que os produtos mantiveram viabilidade das cepas potencialmente probiótica por 84 dias, ações bioconservantes sem a presença de contaminantes patógenos, bem como apresentou qualidade físico-química.

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

ABSTRACT

Changes in the lifestyle of the population contribute to the search for consumption and production of healthier foods. In this environment, meat products can be highlighted, such as those of sheep origin added with potentially probiotic culture, because they present beneficial compounds to health, being considered functional. The objective of this study was to prepare three fermented sausages, sheep meat salami type, one without inoculation of potentially probiotic strains, another containing *Lactobacillus casei* and the last one with *Lactobacillus paracasei*, to monitor and analyze the physicochemical and microbiological characteristics, as well as to evaluate by the predictive microbiology of two mathematical models, the growth with active cells of microorganisms until the end of shelf life. Tests S1 (without probiotics), S2 (with *L. casei*) and S3 (with *L. paracasei*) were produced with lamb shank, bacon, ingredients and additives, matured in an oven with controlled temperature and humidity for 30 days, and stored at 4ºC for up to 84 days. Physical-chemical analyses of pH, titratable acidity, centesimal composition, physical analyses of texture and color were performed. The microbiological tests were performed according to the requirements of the legislation, as well as the count of lactic acid bacteria (BAL) analyzed by pour plate technique in an incubator at 36°C for 48 hours. The mathematical modeling was done by MicroFit software to obtain the adjustments by the equations of the Baranyi and Roberts (BAR) and Gompertz (GOM) models. The physicochemical, physical and microbiological results obtained from Tests S1, S2 and S3 were within the standards set by the legislation, demonstrating Good Manufacturing Practices (GMP) and adequate storage. The count of LAB was performed during 84 days, in which the fermented sausages presented values above 10^7 CFU/g at the end of this period, sufficient to present potentially probiotic activity according to the legislation. The application of the mathematical models proposed in the predictive methodology proved to be efficient only for the BAR model in the two fermented sausages, presenting the BAL curves adjustable and applicable for the same. Given the adequacy of the model, the results of the physicochemical and microbiological analyses, it can be guaranteed that the products maintained viability of the potentially probiotic strains for 84 days, bioconservative actions without the presence of pathogenic contaminants, as well as presented physicochemical quality.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processo produtivo do embutido fermentado tipo salame 23

Figura 2 - Curva de crescimento típica de microrganismos em alimentos.....37

Figura 3 - Simulação do modelo de Baranyi e Roberts (1994) 40

Figura 4 - Parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada ...45

Figura 5 - Etapas do processamento do embutido fermentado tipo salame de carne de ovino probiótico.....54

Figura 6 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Gompertz para *L. paracasei*.....89

Figura 7 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Baranyi e Roberts para *L. paracasei* 90

Figura 8 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Baranyi e Roberts para *L. casei* 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das três formulações de embutidos fermentados. 52

Tabela 2 - Condições operacionais de processo de fermentação e maturação de embutidos fermentados cárneos. 53

Tabela 3 - Valores do pH durante o processamento dos salames. 62

Tabela 4 - Composições físico-químicas de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina. 64

Tabela 5 - Composições físicas e físico-químicas de embutido fermentado tipo salame de carne ovina. 68

Tabela 6 - Análises de umidade e atividade de água realizada nas amostras de embutidos fermentados tipo salame. 72

Tabela 7 - Evolução ao longo do tempo do pH nas amostras de embutidos fermentados tipo salame. 76

Tabela 8 - Resultados da avaliação microbiológica realizada na amostra de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina no tempo 0 após maturação. 79

Tabela 9 - Resultados da avaliação microbiológica realizada na amostra de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina no tempo 84. 79

Tabela 10 - Contagem de bactérias ácido-lácticas ao longo do *shelf-life* dos embutidos fermentados tipo salame. 82

Tabela 11 - Cinética de bactérias ácido-lácticas dos embutidos fermentados em horas. 86

Tabela 12 - Parâmetros estabelecidos a partir da equação do modelo de Baranyi e Roberts e modelo de Gompertz para os embutidos fermentados. 87

Tabela 13 - Dados experimentais ajustados pelos dois modelo de Baraniy e Roberts Gompertz para *L. paracasei.*.....87

Tabela 14 - Dados experimentais ajustados pelos dois modelo de Baraniy e Roberts Gompertz para *L. casei.*.....88

Tabela 15 - Parâmetros de validação matemáticas dos modelos primários às curvas de crescimento do *L. casei* no período de armazenamento à temperatura de 4°C. 92

Tabela 16 - Parâmetros de validação matemáticas dos modelos primários às curvas de crescimento do *L. paracasei* no período de armazenamento à temperatura de 4°C. 92

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 15
2. OBJETIVOS 17
2.1. OBJETIVO GERAL 18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 19
3.1. CARNE DE OVINO 19
3.2. EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME 20
3.3. PROCESSAMENTO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME 22
3.4. ALIMENTOS FUNCIONAIS 25
3.5. BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS 26
3.6. CULTURAS INICIADORAS 27
3.7. PROBIÓTICOS 29
3.7.1. *Lactobacillus* 32
3.7.1.1. *Lactobacillus casei* 33
3.7.1.2. *Lactobacillus paracasei* 35
3.8. MODELAGEM PREDITIVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO 36
3.9. MODELO MATEMÁTICO DE BARANYI E ROBERTS 39
3.10. MODELO MATEMÁTICO DE GOMPERTZ 42
3.11. VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS 45
4. MATERIAIS E MÉTODOS 49
4.1. PREPARO DO MATERIAL 49
4.1.1. Obtenção da carne de cordeiro e toucinho 49
4.1.2. Obtenção das amostras Bacterianas de Referência 49
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 54
4.4. CONTAGEM DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS 55
4.5. ANÁLISES FÍSICAS E FÍSICO-QUÍMICAS 55
4.5.1. pH 55
4.5.2. Acidez Titulável 56
4.5.3. Lipídeos 56

4.5.4. Umidade 56
4.5.5. Atividade de água 56
4.5.6. Cinzas 56
4.5.7. Proteínas 57
4.5.8. Carboidrato e valor calórico 57
4.6. ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS 58
4.6.1. Salmonella 58
4.6.2. Clostridium perfringens 58
***4.6.3. Staphylococus coagulase* positiva** 59
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS 60
4.8. CURVA DO CRESCIMENTO MICROBIANO 60
4.9. MODELAGENS E VALIDAÇÕES MATEMÁTICAS 61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 62
5.1. ACOMPANHAMENTO DO PH NA PRODUÇÃO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME 62
5.2. ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS 64
5.2.1. Determinação de umidade e atividade de água 71
5.2.2. Determinação de pH 75
5.3. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 78
5.4. CONTAGEM DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS 81
5.5. APLICAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS 85
5.5.1. Cinética das bactérias ácido-lácticas 85
5.6. VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS 92
6. CONCLUSÃO 95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96

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 é a mudança no estilo de vida e hábitos alimentares, buscando desta forma 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 alimentos funcionais, os quais vêm assumindo um grande espaço na vida dos consumidores (MARTINS *et al*., 2018; DÍAZ; FERNÁNDEZ-RUIZ; CÁMARA, 2020).

Entre os benefícios relacionados aos alimentos funcionais, destacam-se saúde do trato gastrintestinal, aumento da imunidade, prevenção das doenças cardiovasculares, prevenção de câncer, sensibilidade à insulina e controle da diabetes, 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 potencialmente probiótica (DUBEY *et al*., 2016; VASCONCELOS *et al*., 2021).

Dentro deste contexto, admite-se que a ingestão destas culturas chamadas bactérias ácido-lácticas, proporcione resultados benéficos ao longo do tempo de consumo. Esses microrganismos, quando presente nos alimentos, classifica-os em “alimentos funcionais” e, devido suas ações 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 (SALOTTI DE SOUZA *et al*., 2019; PRADO *et al*., 2021).

Existem muitos gêneros de bactérias com alegações probióticas, dentre eles, os *Lactobacillus* e Bifidobactérias. As bactérias ácido-lácticas (BAL) também agem na bioconservação e tem grande influência nas características sensoriais de vários alimentos, contribuindo para melhoria de sua textura, sabor, odor e estabilidade de produtos fermentados através da síntese de exopolissacarídeos,

como por exemplo, os derivados de leite e carnes (AZNAR; ZUÑIGA, 2017; BIS-SOUZA *et al*., 2020). Neste contexto, 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 produtos constituem um grupo de alimentos de alto valor nutricional, tendo em vista que são fontes ricas em proteínas, apresentando um elevado valor biológico, diversas vitaminas, minerais e benefícios ao corpo, como fortalecimento do sistema imunológico (FERNANDES *et al*., 2015; BURIN *et al*., 2016).

Dentre os produtos derivados de carnes mais consumidos, têm-se os embutidos fermentados tipo salame, os quais apresentam condições ideais para o desenvolvimento de patógenos, mas também para as bactérias ácido-lácticas, que podem estar presentes naturalmente neste produto, ou serem inoculadas durante a formulação (PAVLI *et al*., 2020).O processamento destes produtos tem como princípio básico a utilização de fermentação como método de conservação, podendo combinar com outros métodos, permitindo a obtenção de um alimentos estável à temperatura ambiente (RITTER *et al*., 2020). Diante disso, ao inocular as BAL, podem apresentar função bioconservadora devido à produção de bacteriocinas que inibem microrganismos patógenos indesejáveis; caso permaneçam em quantidade viável durante todo o processo de fabricação e passagem pelo trato gastrointestinal (CASTRO *et al*., 2015; BIS-SOUZA *et al*., 2020).

Diante disso, existe cada vez mais a necessidade de entender a incorporação dessas bactérias em produtos alimentícios e seu efeito durante seu crescimento. Para isso, usa-se o campo da microbiologia preditiva como estudo do crescimento microbiano por meio das condições ambientais, responsável por mensurar a segurança do alimento (NUNES *et al*., 2021). Sendo assim, existe grande importância na escolha do modelo matemático mais adequado para representar este crescimento, bem como faz-se necessário o uso de modelos evitando comprometimento na exatidão dos ajustes matemáticos para garantir a viabilidade e segurança do alimento inoculado de cepas microbianas a ser estudado (CEPEDA *et al*., 2013).

2. PROBLEMA DE PESQUISA E HIPÓTESE

É possível manter as características físico-químicas, microbiológicas e a vida útil de embutidos fermentados tipo salame de carne de ovino através da inoculação de cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* ?

A inoculação de cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* em embutidos fermentados tipo salame de carne ovina, devem manter as características físico-químicas, microbiológicas, bem como a vida útil dos mesmos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar embutidos fermentados tipo salame de carne ovina, acompanhar e analisar as características físico-químicas, microbiológicas, bem como avaliar a partir da microbiologia preditiva de dois modelos matemáticos o crescimento com células ativas dos microrganismos até o final do prazo de validade.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver três embutidos fermentados à base de carne de cordeiro, sendo um sem inoculação de cepas potencialmente probióticas, outro inoculado com o *Lactobacillus casei* e o último inoculado com o *Lactobacillus paracasei*;
- Avaliar as características físico-químicas, físicas e microbiológicas dos embutidos formulados;
- Avaliar e validar o crescimento e viabilidade das bactérias ácido-lácticas através dos ajustes de dois modelos matemáticos durante a vida útil dos embutidos;

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1. 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 à elevada capacidade de adaptação desses animais às condições climáticas do semiárido, 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 mantem 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). 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 a prática da ovinocultura evolua mais, a qualidade e características sensoriais das carnes que chegam ao consumidor é um fator primordial. Neste contexto, a carne de cordeiro vem se 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, minerais, ácido linoleico 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 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, tendo em vista que este produto não é bem aproveitado 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.

4.2. 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 n° 22 (BRASIL, 2000). As características sensoriais de textura, cor e odor dos embutidos devem ser característicos e os principais parâmetros físico-químicos 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*: $5x10^2$/g de produto e *Staphylococcus coagulase* positiva: $5x10^3$/g de produto (BRASIL, 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 texura, 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 lático, o qual proporciona sabor forte e característico aos produtos (SANTA *et al*., 2014).

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 atingirem 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 lático a partir dos açúcares presentes na massa cárnea, que a partir disso, consequentemente reduzem o pH e auxiliam na 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 apresenta maior qualidade (ERTÜRKMEN *et al*., 2016; KNAPIK *et al*., 2017).

Os embutidos cárneos no geral são vistos como produtos que apresentam elevado teor de gordura animal e presença de diversos aditivos combinados, gerando uma preocupação para consumidores focados em alimentos mais saudáveis. 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 potencialmente probióticos no processo fermentativo auxilia no processo de conservação além de aumentar os benefícios à saúde do consumidor presentes no produto final, transformando-o assim, em um alimento de fonte mais saudável considerado funcional (LEROY; VERLUYTEN; DE VUYST, 2006; BEM SLIMA *et al*., 2017).

4.3. PROCESSAMENTO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME

Os embutidos cárneos passam por dois principais processos: fermentação e maturação, os quais além de auxiliar na durabilidade dos embutidos, 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 7 etapas, conforme a Figura 1:

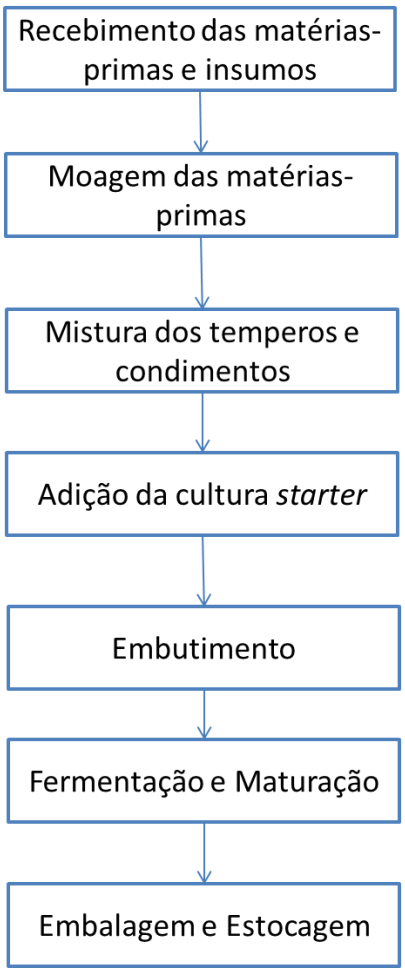


Figura 1 - Fluxograma do processo produtivo do embutido fermentado tipo salame

Fonte: (CASSOL, 2018)

O processo de fabricação do embutido fermentado tipo salame consiste de três 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). Além disso, na massa de embutido após culturas *starters*, podem ser adicionadas de novas cepas bacterianas, como por exemplo, microrganismos potencialmente 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 lático a partir de hexoses, bem como a redução do pH 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). Além disso, nesta etapa ocorrem mudanças significativas que garantem uma melhor segurança e características sensoriais, como: redução 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, devendo-se 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 valor de pH entre 4,8-6,2 e

atividade de água ≤ 0,9 (HOLCK *et al*., 2011, KIM *et al*., 2012). Na etapa do processo, o produto deve conter características sensoriais adequadas, sendo este um dos principais fatores que contribuem aceitação do embutido.

4.4. ALIMENTOS FUNCIONAIS

Segundo a Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL,1999), 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 consequentemente, melhorar o bem-estar do consumidor (TUFARELLI; LAUDADIO, 2016).

Diante dos benefícios, nas últimas décadas, a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, visto que esses alimentos são considerados fontes de nutrientes e 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 apresenta a lista de algumas substâncias presentes em alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou saúde, são eles: ácidos graxos, que auxiliam positivamente na manutenção dos níveis normais de triglicerídeos; carotenoides, 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 e probióticos e prebióticos, que contribuem para o equilíbrio da microbiota (BRASIL, 2008).

Para que estas substâncias dos alimentos funcionais sejam eficazes é preciso que seu uso seja regular e esteja associado ao aumento da ingestão de

frutas, verduras, cereais integrais, carne, e alimentos ricos em ômega-3 (VIDAL *et al*., 2011). Por esta razão, a fim de evitar doenças crônicas e graves, os consumidores vêm adotando hábitos alimentares mais saudáveis, buscando um equilíbrio alimentar através destes produtos. Neste contexto, o mercado de alimentos funcionais é predominantemente de produtos contendo bactérias ácido-lácticas potencialmente probióticas, em função da imagem positiva destas bactérias devido aos benefícios ao trato gastrointestinal. Por este motivo, a demanda por alimentos funcionais é crescente para desenvolvimento de produtos funcionais com adição de cepas com alegações probióticas nas indústrias (BARCELLOS; LIONELLO, 2011; BIGLIARDI; GALATI, 2013).

4.5. 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 devido à desnaturação das proteínas, o que resulta na expulsão da água. Além disso, são muito utilizadas em indústrias e pesquisas com função potencialmente 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 lático, acético e propiônico, sendo eles responsáveis pela acidificação do meio, interferindo na manutenção do potencial de membrana e consequentemente reduzindo o pH intracelular, dessa forma, é capaz de inibir o desenvolvimento de muitos microrganismos patogênicos e esporulados. 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 os mais utilizados 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, consequentemente, 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 (MESSAOUDI *et al*., 2013; PEHRSON, 2013).

São classificadas como bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos, divididas em mesófilas e termófilas, com temperaturas ótimas em 30°C e 50°C, respectivamente (FERREIRA, 2005). As principais características necessárias são: não serem patógenas, fácil crescimento, geneticamente estável, viável, abundante e sobreviverem a baixo pH. 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).

As BAL apresentam também outras características importantes para saúde, como a redução dos riscos de intoxicação, redução da intensidade de tratamentos físicos e de conservadores sintéticos. As mesmas, ao entrarem em contato com o intestino, colonizando-o, constituem um grupo conhecido das bactérias com alegações probióticas, cujas atividades auxiliam na proteção do intestino e sistema imunológico (FERREIRA, 2012; COSTA, 2016).

4.6. 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, bem como a habilidade de promover segurança ao produto (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 a produção do sabor e textura, bem como promover a redução do nitrato a nitrito, em caso de produtos 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 e do teor de nitrito residual (LYOCARNI, 2013; MAFRA *et al*., 2020).

Os microrganismos das culturas iniciadoras devem apresentar como principais características, 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 (BULTOSA 2015; YAO *et al*., 2020). Para culturas destinadas à indústria de embutidos cárneos, deve ser tolerante ao sal, 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 (CIROLINI, 2010). Quando associa-se o açúcar à temperatura de fermentação, determina-se a taxa de formação de ácido lático, consequentemente, elevam-se as chances de desenvolvimento de microrganismos responsáveis por promover o sabor e acidez (PRISCO; MAURIELLO, 2016). A produção do ácido lático 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* (AOAC, 2000; BRASIL, 2000). As culturas são capazes de desenvolver atividade metabólica desejável, com a finalidade de melhorar sua conservação, segurança e características sensoriais do produto final (TYÖPPÖNEN *et al*., 2003; CIROLINI, 2010).

4.7. PROBIÓTICOS

De acordo com a resolução RDC n°2/2002, 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 potencialmente 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 potencialmente probióticos, incialmente 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 microrganismos potencialmente 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, estas cepas ocupam sítios de ligação presentes na mucosa do intestino que poderiam ser ocupados por bactérias patogênicas, com isso, possibilita a eliminação dos patogênicos do trato gastrointestinal. No caso da competição por nutrientes, as mesmas cepas com alegações 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 pelas bactérias potencialmente probióticas, 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 de microrganismos potencialmente 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, o qual 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. 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, sendo os mais utilizados na indústria alimentícia: *Lactobacillus casei*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* e *L. plantarum* (GOLDSTEIN; TYRREL; CITRON, 2015). Culturas potencialmente probióticas normalmente são utilizadas nos processos alimentícios, pois promovem um melhor sabor nos produtos finais (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/g ou L e a porção diária deve ser indicada no rótulo (BRASIL, 2007).

Para o desenvolvimento destas bactérias com viabilidade celular ao longo do tempo, o produto também deve atender alguns parâmetros que melhorem a sobrevivência, como: faixas de pH e temperatura adequadas, embalagens com barreira de oxigênio, adição de ingredientes antioxidantes, bem como os microrganismos com alegações probióticas devem se mostrar resistentes às 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 estas

cepas é complexa e também apresenta influências na sobrevivência destes 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 no produto final, a fim de garantir um produto de qualidade e com bactérias potencialmente probióticas ativas para atuação de seus efeitos benéficos durante o consumo (RANADHEERA *et al*., 2012).

4.7.1. *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 lático, bem como é considerado heterogêneo, comumente utilizado para promover benefícios à saúde do consumidor por meio das cepas com alegações 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, tendo em vista que as mesmas necessitam sobreviver durante todo o processo do alimento, até que o prazo de validade encerre, 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 paracase*i devido o poder de sobrevivência e multiplicação no trato gastrointestinal após a ingestão (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).

Apresentam elevado valor comercial em aplicação de novos produtos, pois tem como finalidade conferir aroma, sabor, textura, bem como auxiliar na bioconservação dos alimentos pelo processo de acidificação pela produção do ácido láctico (BURITI; SAAD, 2007; TERPOU *et al*., 2019). Além disso, são classificados por possuírem atividade antimicrobiana contra microrganismos patógenos, contaminantes e deteriorantes em alimentos (SHOKRYAZDAN *et al*., 2017).

4.7.1.1. *Lactobacillus casei*

O *Lactobacillus casei* é uma espécie amplamente conhecida, devido à popularização de 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 sobreviverem 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 produzirem substâncias bacteriocinas termoestáveis e biossurfactantes, promovendo a possibilidade de aplicação como bioconservante em alimentos durante o prazo de validade, podendo inibir principalmente bactérias gram negativas patogênicas devido à 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 bactéria potencialmente probiótica utilizada 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, mostraram-se eficazes contra tumores e 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, restauração da microbiota intestinal e controlar o excesso de gases, além de apresentar melhorias na digestão e reduzir a intolerância ao leite (PEDONE *et al*., 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 o mesmo de forma efetiva balanceando a microflora intestinal, devido à resistência ao ácido gástrico e bile, aderindo à mucosa do intestino, sendo assim, eficientes na luta contra patógenos, 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 (PEDONE *et al*., 2000; SIDIRA *et al*., 2015).

4.7.1.2. *Lactobacillus paracasei*

As culturas potencialmente probióticas presentes em um alimento compostas por *L. paracasei* são capazes de inibirem o crescimento de *Listeria* durante a passagem pelo trato gastrintestinal, 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 microrganismo benéfico 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 lático 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, 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, por este motivo são comumente aplicados como potencialmente 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).

4.8. 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 sigmoidal (ZWIETERING *et al*., 1990).

No crescimento microbiano em alimentos são observadas quatro 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, cujo 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 2.

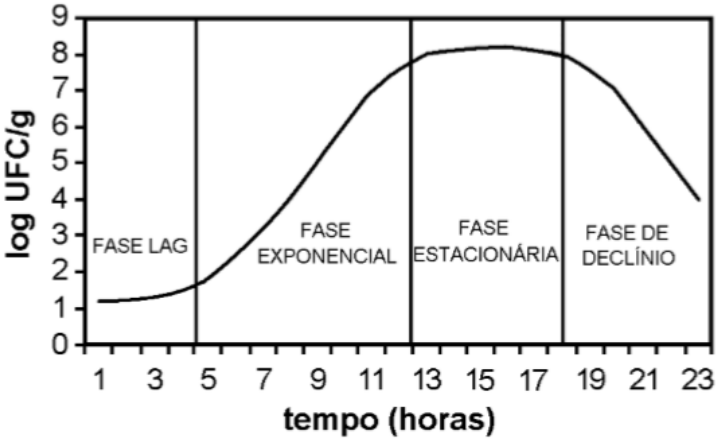


Figura 2 - Curva de crescimento típica de microrganismos em alimentos

Fonte: (ROBAZZA, 2010)

Além das quatro fases, os modelos preditivos também compreendem: (l) duração da fase lag; (μ) velocidade específica máxima de crescimento e (A) densidade populacional máxima de crescimento final (BATY; DELIGNETTE-MULLER, 2004). O crescimento microbiano apresenta uma integração de habilidades da microbiologia tradicional com a matemática, estatística e sistemas

de informação, aumentando 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). 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, predições e comparações (ROBAZZA, 2010).

Diante disso, a microbiologia preditiva permite a avaliação dos processos de conservação de alimentos e são aplicados a diversos alimentos reduzindo testes microbiológicos (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, não podem ser extrapolados para condições com 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 (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.

4.9. MODELO MATEMÁTICO DE BARANYI E ROBERTS

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 (y0), a fase de adaptação ou fase lag (λ), a velocidade específica máxima de crescimento (μmáx) e a população máxima de crescimento atingida (ymáx), os quais podem ser realizados de diferentes formas pelas equações (LONGHI, 2016). 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 com alegações probióticas, 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 sendo 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 3.

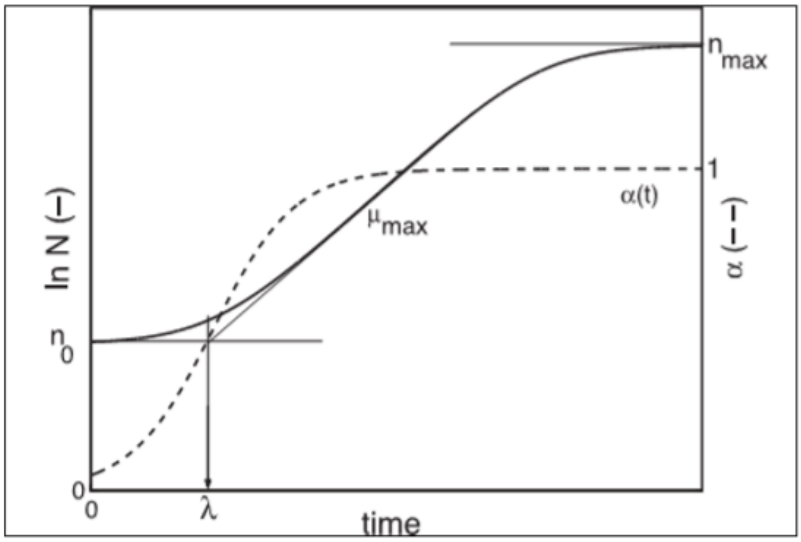


Figura 3 - Simulação do modelo de Baranyi e Roberts (1994)

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.

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

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.

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

Onde a velocidade específica da substância crítica v, pode ser considerada igual à velocidade específica máxima de crescimento da cultura ($\mu_{máx}$), 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.

$$\mu_{est} = 1 - \left[\frac{N\ (t)}{N_{máx}}\right]^{m} \tag{3}$$

Tendo m como um parâmetro da curvatura e $N_{máx}$ 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.

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

Esta tem solução explícita, apresentada na equação 5.

$$D(t) = y_0 + \mu_{máx}\, A(t) - \left[\frac{1}{m}\right] \ln\left(1 + \frac{\exp\left(m \mu_{máx}\, F(t)\right) - 1}{\exp\left(m\ [y_{máx} - y_0]\right)}\right) \tag{5}$$

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..

$$A(t) = t + \left[\frac{1}{\mu_{máx}}\right] \ln\left(\frac{q_0 + \exp(-\mu_{máx} t)}{1 + q_0}\right) \tag{6}$$

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.

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

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

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

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

$$\lambda = \frac{h_0}{\mu_{máx}} \tag{9}$$

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.

4.10. MODELO MATEMÁTICO DE GOMPERTZ

O modelo de Gompertz também é citado na literatura como uma das principais equações que se ajustam ao crescimento em nível primário (ARROYO-LÓPEZ *et al*., 2012). Este 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 sigmoidal produzida com

quatro fases comparáveis às curvas de crescimento microbiológico: *lag*, aceleração, desaceleração e estacionária (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 $(\mu_{máx})$, 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 potencialmente probióticos, sendo úteis para identificar as etapas da curva de crescimento, e consequentemente as principais condições cujo crescimento é mais adequado para garantir quantidade suficiente de microrganismos ativos durante o prazo de validade do produto. O modelo de Gompertz modificado promove ajuste aos dados experimentais para bactérias ácido láticas nos alimentos (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.

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

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*), $\mu_{máx}$ (velocidade específica máxima de crescimento) e A (aumento logarítmico da população) pelas seguintes equações:

$$\lambda = \mathrm{d}.\frac{1}{b} \tag{11}$$

$$\mu = \frac{b.a}{exp} \tag{12}$$

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.

$$Y\ (t) = A \exp\left(-\exp\left(\frac{\exp(1)\mu_{máx}}{A}\ [\lambda - \mathrm{t}] + 1\right)\right) \tag{13}$$

Sendo:

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

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

$\mu_{máx}$ = 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 4.

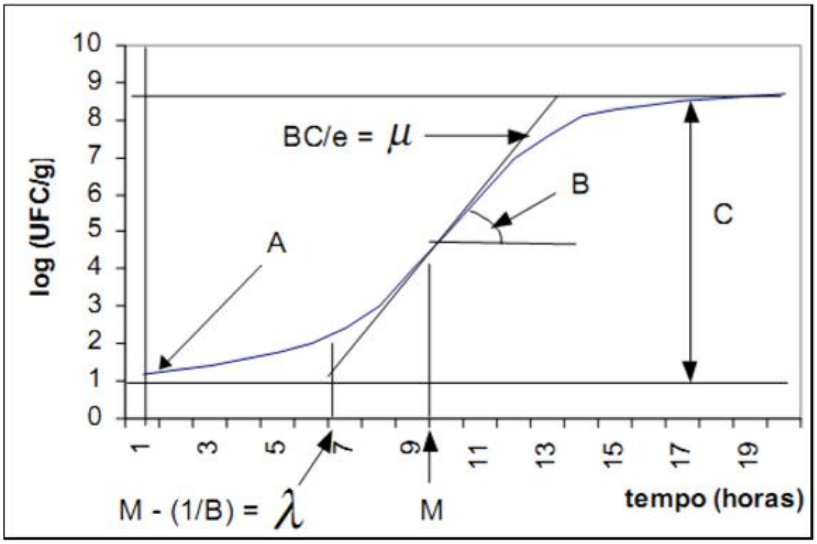


Figura 4 - Parâmetros associados com a equação de Gompertz modificada

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

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).

4.11. VALIDAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

A validação permite ao pesquisador testar a eficácia do modelo utilizado na predição do comportamento dos microrganismos com alegações probióticas 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 patógenos ou potencialmente 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.

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

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, entretanto, quando o fator bias é igual a 1 indica um acordo perfeito entre os valores preditos e observados. 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.

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

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.

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

Onde n* = número de grau de liberdade.

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.

$$R^2 = \frac{SQRL}{SQT_c} \tag{19}$$

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.

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

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado de acordo com as seguintes etapas: preparação do salame de ovino, análise físico-química e física, análise microbiológica, análise de conservação durante a vida de prateleira e avaliação do crescimento microbiano de duas bactérias 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).

5.1. 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.

5.1.1. 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.

Os demais ingredientes utilizados na fabricação dos embutidos fermentados foram adquiridos em supermercados da região metropolitana de Recife – PE.

5.1.2. Obtenção das amostras Bacterianas de Referência

As cepas das culturas iniciadoras e das cepas de *Lactobacillus casei e paracasei* utilizadas foram adquiridas da empresa COANA PROBIOTICAL cepa

liofilizada *L. casei* (LC03) e *L. paracasei* (LPC00) na concentração de 10^{11} UFC/mL.

5.1.3. Ativação dos Inóculos

Anteriormente à inoculação no embutido fermentado tipo salame, realizou-se lentamente o descongelamento das cepas com alegação probióticas de *Lactobacillus* pelo processo "overnight" em geladeira à temperatura entre 8°C e 4°C por 48 horas. 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 para cada cepa, a fim de pré ativá-las. As mesmas foram incubadas por aproximadamente 24 horas em estufa Incubadora B.O.D. a 36 ± 1°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 ativadas a 15 ± 1°C em 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo as cepas bacterianas, adicionado à massa dos embutidos após a introdução de todos os demais ingredientes e da cultura *starter*, a qual também necessitou de ativação. A mesma foi pré-ativada em água adicionada de 0,2g de sacarose por 30 minutos para cada formulação S2 (*L. casei*) e S3 (*L. paracasei*).

Após o descarte do sobrenadante de cada cepa, e anteriormente à inoculação das mesmas nas formulações, retirou-se do volume total de ambos precipitados para cada cultura exatos 1mL a fim de realizar a contagem do número de células viáveis de ambos *Lactobacillus* no momento da inoculação dos mesmos para produção dos embutidos. Esta contagem ocorreu em placas de petri com ágar MRS através da técnica de plaqueamento por profundidade (*Pour plate)*, incubando-se as mesmas por aproximadamente 48 horas em estufa incubadora B.O.D. à 36 ± 1°C. A concentração celular inicial de *L. casei* obtida após centrifugação e adicionada a Formulação S2 foi estimada de 7,5 x 10^7 UFC/mL de inóculo; e para *L. paracasei* na Formulação S3 de 7,5 x 10^7 UFC/mL de inóculo.

5.2. PRODUÇÃO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME

Foram elaboradas três formulações de embutidos fermentados 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 qual das cepas potencialmente probióticas irão apresentar melhor curva de crescimento, com células viáveis até o produto final, bem como qual delas se manterá ativa até o fim da vida de prateleira de 84 dias do embutido, evitando 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 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 três formulações de embutidos fermentados

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
Lactobacillus casei	-	0,05	-
Lactobacillus paracasei	-	-	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) contendo 4 lâminas afiadas por 15 minutos até que a massa cárnea se tornasse pastosa, adicionando o toucinho para que fosse possível obter uma massa homogênea e emulsionada. Em seguida, foram introduzidos ao *cutter* os demais ingredientes, sendo por último a adição das culturas *starters* (e as cepas de *Lactobacillus casei* (COANA) para o Ensaio S2 e *Lactobacillus paracasei* (COANA) para o Ensaio S3 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 controladas ao longo do 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 (%)
	Fermentação	
1	25	89
2	24	89
3	23	88
4	22	88
5	21	87
6	20	86
7	18	80
	Maturação	
8-30	15	75
	Armazenamento	
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 físicas e físico-químicas no tempo 0 após a maturação a contar da vida útil do produto.

O processamento do embutido fermentado tipo salame seguiu as etapas da Figura 5 a seguir.

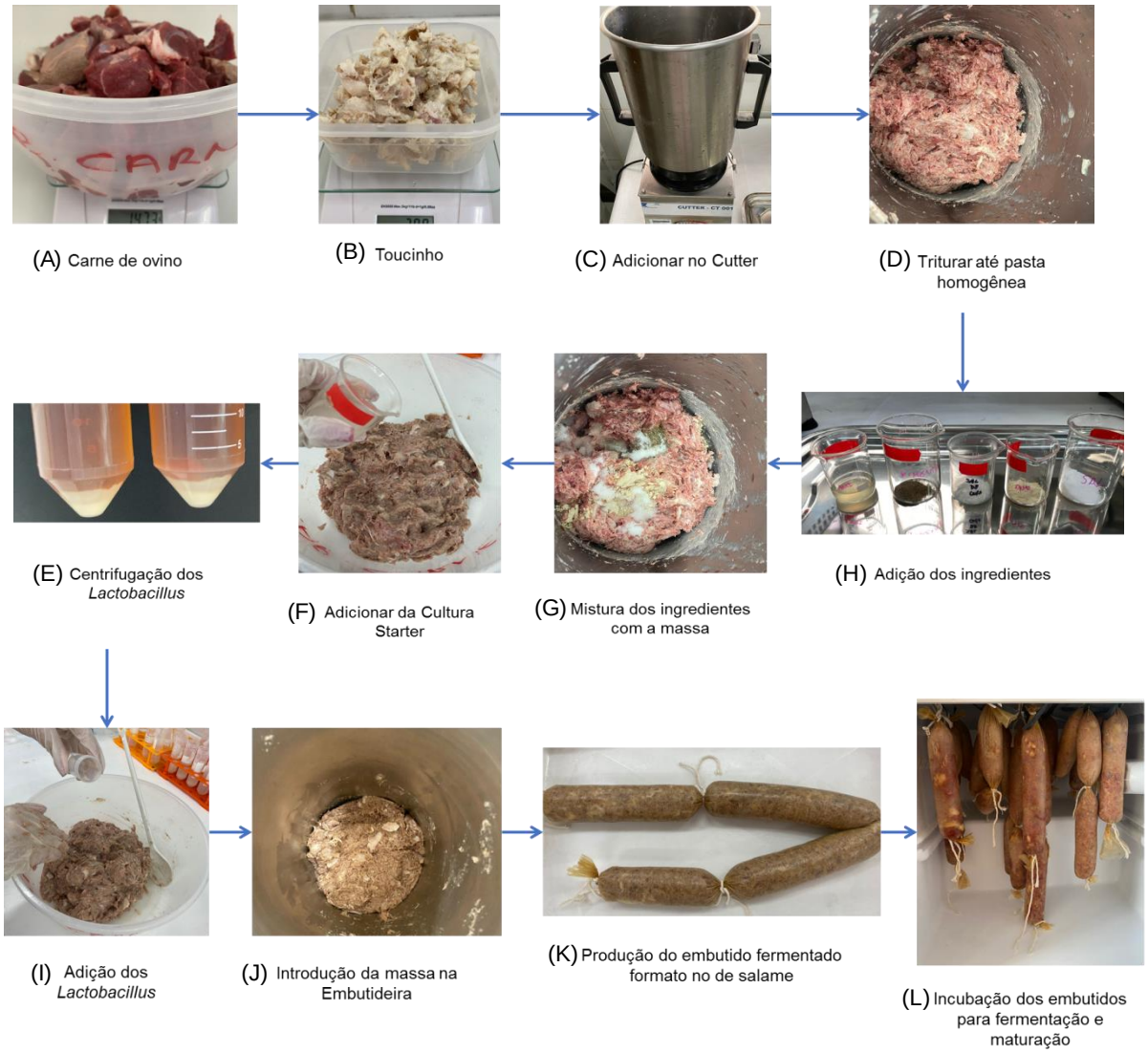


Figura 5 - Etapas do processamento do embutido fermentado tipo salame de carne de ovino probiótico

Fonte: Autor, 2022.

5.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS E SUAS DILUIÇÕES

Foram pesadas aproximadamente 25g de cada uma das amostras de embutidos, 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 inicial de 10^{-1}. A partir da mesma foram preparadas as demais diluições seriadas posteriores até 10^{-10} para cada embutido contendo suas respectivas cepas de *Lactobacillus*.

5.4. CONTAGEM DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

O controle do crescimento das alegações probióticas *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus casei* foi realizado partir da contagem total em placas de petri das bactérias ácido-lácticas viáveis. Para isto, coletou-se alíquotas de 1mL da amostra diluída em solução salina peptonada, introduzindo-se 1mL nas demais 10 diluições seriadas de soluções salinas preparadas para cada cepa bacteriana. Com isso, aplicou-se cada diluição em placa de petri por meio da técnica de plaqueamento em profundidade (*Pour plate*) e sobrecamada em meio ágar MRS (suplementado com 2% de glicose p/v). 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 contadas manualmente e expressas em UFC/g.

Para analisar o crescimento das cepas potencialmente probióticas, 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 *Lactonacillus* na formulação.

5.5. ANÁLISES FÍSICAS E FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas realizadas foram: pH, acidez titulável, umidade, lipídeos, proteínas, cinzas, carboidratos e atividade de água, e análises físicas: textura e cor. Todas as análises seguiram os métodos analíticos de acordo suas respectivas especificações. As mesmas foram realizadas após a produção dos embutidos fermentados tipo salame, inoculação das cepas potencialmente probióticas, fermentação e período de maturação dos mesmos, sendo algumas análises realizadas no tempo 0 após maturação e outras no tempo 84, no fim do prazo de validade.

5.5.1. pH

Para a determinação do pH, foi realizada a calibração do equipamento pHmetro, 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, e a partir disso, a aferição passou-se a ser feita a cada 14 dias durante 84 dias (IAL, 2008).

5.5.2. Acidez Titulável

Foi utilizado para esta determinação o método que consiste em transferir amostras dos embutidos macerados para um béquer com água destilada, em seguida filtrá-las e transferidas para um balão volumétrico 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 a maturação, quanto após 84 dias de vida de prateleira do produto (IAL, 2008).

5.5.3. 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. Este procedimento foi realizado em triplicata no dia 0 após a maturação.

5.5.4. Umidade

Foi realizada a pesagem as amostras previamente preparadas e levadas à estufa a 105°C aproximadamente durante 8 horas, esfriada em dessecador e pesada para cálculo final. A operação foi repetida até uma massa constante ser alcançada (IAL, 2008). Este procedimento foi realizado em triplicata nos dias 0 após a maturação e 84 ao final do prazo de validade.

5.5.5. Atividade de água

Esta análise 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 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. A determinação da atividade de água foi feita logo após o processo de maturação e, ao final da vida de prateleira, nos tempos 0 e 84 dias de armazenamento para cada formulação em triplicata.

5.5.6. Cinzas

Primeiramente pesou-se as amostras previamente preparadas levou as mesmas até a mufla a 500°C aproximadamente durante cerca de 6 horas, esfriada em dessecador e pesada. A operação foi repetida até massa constante (IAL, 2008). Este procedimento foi realizado em triplicata no tempo 0 após a etapa de maturação.

5.5.7. Proteínas

O percentual de proteína foi obtido a partir do conteúdo de nitrogênio total da amostra, utilizando-se o método de Kjeldahl, o qual é realizado por três etapas, na seguinte ordem: digestão, destilação e titulação (IAL, 2008). Este procedimento foi realizado em triplicata no tempo 0 após o período de maturação.

5.5.8. Carboidrato e valor calórico

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

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

5.5.9. Determinação de cor

As três amostras submetidas aos três ensaios, 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).

5.5.10. Análise de textura

Para a análise de textura os embutidos foram cortados em cilindro, utilizando-se texturômetro Brookfield (CT3). A velocidade do teste de 1,5mm/s e para o pré e pós teste 10mm/s, o qual foi analisado o parâmetro de dureza (N). 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.

5.6. 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 (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 *Eschericha coli* (APHA, 2005).

5.6.1. Salmonella

A análise de *Salmonella* foi feita segundo metodologia recomendada pela APHA em triplicata nos tempos 0 após maturação e 84 ao fim do prazo de validade. No pré-enriquecimento, um volume de 25 mL das amostras foi adicionado a 225 mL de caldo lactosado. Esses homogenatos foram incubados a 37 ± 1°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 ± 1°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 ± 1°C, por 24 horas, para isolamento de colônias típicas de *Salmonella spp*.

5.6.2. Clostridium perfringens

Inicialmente foi necessário realizar diluições seriadas das amostras, tomando 25mL da amostra para 225mL de solução diluente, somando à alíquota de 0,1mL (100µL) da amostra em superfície do Perfringens Agar Base (TSC/SFP) solidificado, espalhando com alça de Drigalski estéril e em seguida distribuiu-se sobrecamada do Agar, aguardando a solidificação do meio, e então incubou-se as

placas em jarra de anaerobiose à temperatura de 35 ± 1°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 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, foram feitos os testes para confirmação do *Clostidium Perfringens*, que 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 ± 1°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, incubou-se a 35 ± 1°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. Esta análise foi realizada nos tempos 0 após maturação e 84, em triplicata.

5.6.3. Staphylococus coagulase positiva

Inicialmente as placas foram inoculadas com 0,1mL de cada diluição pela técnica do espalhamento, as mesmas foram incubadas a 35-37 ± 1°C por 48h e após esse período, as colônias presuntivas típicas e atípicas de E*stafilococos coagulase positiva* foram contadas, considerando e segregando colônias típicas e colônias atípicas. Três 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 ± 1°C por 24h. Após esse período, as culturas foram repicadas para caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 35-37 ± 1°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 35-37ºC e observando a formação dos coágulos por 6h. Foram considerados positivos os coágulos +3 e +4. No caso do teste de aglutinação em látex (Staphytect 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 foi calculado em função do número de colônias típicas e/ou atípicas obtidas, fator de diluição e porcentagem de colônias confirmadas. A análise realizada em triplicata nos tempos 0 após maturação e 85 após o prazo de validade.

5.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises físico-químicas, microbiológicas e a avaliação do crescimento das bactérias ácido lácticas de *Lactobacillus*, foram realizadas ao longo do período de 84 dias de vida útil. Com base nos resultados que foram obtidos nessas análises, fez-se necessário a comparação entre os Ensaios em relação aos valores finais obtidos, utilizando para isso as ferramentas estatísticas de desvio padrão e análise de variância (ANOVA), utilizando teste Teste de Duncan's com 95% de confiança calculado utilizando o Software Statistic 8.0 (DUTCOSKY, 2007).

5.8. 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 14 em 14 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 *Lactobaccilus casei e Lactobaccilus paracasei*, a fim de estabelecer a melhor diluição no qual ocorresse o crescimento mais adequados aos ajustes matemáticos.

5.9. MODELAGENS E VALIDAÇÕES MATEMÁTICAS

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

Os dois modelos matemáticos selecionados para a modelagem e obtenção de alguns parâmetros importantes diante do crescimento do *Lactobacillus paracasei e Lactobacillus casei* nos salames foram: o modelo de Baranyi e Roberts (BAR) e de Gompertz (GOM).

Os ajustes das curvas do crescimento foram feitos nos softwares MicroFit (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) e DMfit, na interface do *Combase.cc*. tornando possível o ajuste automático de dados experimentais a modelos microbiológicos de crescimento teórico, possibilitando o ajuste e validação matemática através de cálculos estatísticos de forma fácil e rápida. Os mesmos foram utilizados 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 nestes softwares para avaliar a eficiência das cepas com alegações probóticas a fim de testar e validar o experimento obtendo uma concentração dos microrganismos em função do tempo na fase de crescimento dos mesmos, ajustando para isso, os resultados dos parâmetros avaliados (SIQUEIRA *et al.*, 2014).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ACOMPANHAMENTO DO pH NA PRODUÇÃO DO EMBUTIDO FERMENTADO TIPO SALAME

Durante o processo de produção do embutido fermentado, foram acompanhados o pH das amostras.

A análise inicial do pH foi realizada em quintuplicata conforme está representado na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores do pH durante o processamento dos salames

Ensaios	Tipo do Salame	pH inicial do Salame antes da fermentação	pH final do Salame depois da maturação
S1	Padrão	5,82 ± 0,14[ab]	5,16 ± 0,02[a]
S2	*L. casei*	5,85 ± 0,03[a]	5,19 ± 0,0[a]
S3	*L. paracasei*	5,75 ± 0,0[b]	5,01 ± 0,02[b]

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 95% de confiança

Fonte: Autor, 2022.

Avaliar o pH de início do processo e final da maturação é de extrema importância, pois identifica a evolução e eficiência das culturas iniciadoras e dos *Lactobacillus* inoculados na produção inicial de ácido láctico, o que permite demonstrar que o processo ocorreu com pH adequado e se manteve apto para auxiliar no desenvolvimento das bactérias com alegações probióticas ao longo processo.

No início da produção, percebeu-se que os valores de pH entre as formulações apresentaram valores próximos, contendo diferença significativa apenas entre os ensaios S2 e S3, demonstrando que nesta etapa inicial os ensaios S2 e S3, não sofrem influência das cepas dos *Lactobacillus* ao ponto de se diferirem do ensaio padrão. Os resultados iniciais de pH obtidos estavam de acordo com estudos apontados de Ordóñes *et al*., 2005; Andrade, 2006; Carvalho, 2014, sobre este mesmo produto os quais também introduziram cepas

com alegações probióticas 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, como mostra o resultado na Tabela 3, apesar da não diferença estatística entre as amostras, percebeu-se a queda dos valores (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 demonstraram que após a maturação, os *Lactobacillus* auxiliaram as culturas *starters* na produção de ácido láctico, pois 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 estabilização da cor, sabor e aroma ao produto (FIEIRA, 2014; LIMA *et al*., 2011).

O processo de maturação foi realizado durante 21 dias mantendo a umidade e temperatura controladas, sem variação ao longo do tempo, garantindo a qualidade e segurança do produto. Devido a este controle, os valores de pH obtiveram uma queda eficiente e adequada durante o processo de fermentação e maturação. No final da maturação, a acidificação se permanece atingindo níveis de pH de 5,0 a 5,3, o que coincide com o ponto isoelétrico das proteínas da carne,

ocorrendo a liberação mais rápida da água do produto, o que facilita a secagem do produto final (MENDES *et al*., 2014).

6.2. ENSAIOS FÍSICO-QUÍMICOS

Os resultados obtidos das características físicas e físico-químicas dos embutidos fermentados tipo salame de carne ovina estão descritos na Tabela 4 e 5. As mesmas foram comparadas com valores estabelecidos na legislação IN n° 22 (BRASIL, 2000).

Tabela 4 – Composição centesimal de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina

Parâmetro	Ensaio			Legislação
	S1	S2	S3	
Umidade (%)	42,71 ± 0,03[a]	45,72 ± 0,04[a]	41,01 ± 0,02[a]	Máx. 40,00
Cinzas (%)	3,16 ± 0,82[a]	2,67 ± 0,3[a]	2,73 ± 0,04[a]	-
Proteína (%)	37,10 ± 4,28[a]	34,05 ± 1,67[a]	29,45 ± 0,50[a]	Mín. 20,00
Lipídeos (%)	30,69 ± 0,77[a]	33,85 ± 8,04[a]	29,72 ± 3,06[a]	Máx. 35,00
Carboidratos totais (%)	9,62	11,59	8,06	Máx. 4,00
Valor Calórico (Kcal)	454,89	483,76	427,27	-

Médias seguidas de mesma letra sobrescrita nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 95% de confiança
Ensaio S1: Salame padrão sem *Lactobacillus*.
Ensaio S2: Salame com *Lactobacillus casei.*
Ensaio S3: 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.

A discussão dos resultados obtidos para os teores de umidade será detalhada no tópico seguinte, quando se avaliará o comportamento da umidade ao longo do tempo.

Em relação às cinzas, percebe-se que não houve diferença significativa entre eles, 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. Para o teor das cinzas são avaliados os ingredientes obrigatórios e não obrigatórios na adição da massa do salame, demonstrando a importância do impacto que estas substâncias causam no valor das mesmas obtidas no produto final (ROSELINO *et al*., 2018). Outros estudos que obtém cepas com alegações 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 também podem estar relacionados às variações de umidade e quantidade de sal adicionado.

De acordo com a Tabela 4, os valores encontrados em relação ao teor de proteína não apresentaram diferença significativa entre os Ensaios, bem como se demonstram condizentes em relação aos padrões mínimos exigidos pela legislação IN n°22/2000 em no mínimo 20% (BRASIL, 2000). As principais causas de variação nos valores brutos de proteína podem ser atribuídas 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, o qual 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 (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 *et al*, 2018).

Segundo a legislação vigente, o teor de gordura do salame é no máximo 35,00%, o que demonstra coerência nos valores médios encontrados dos três Ensaios produzidos, os quais não foram encontrados diferença estatística entre eles. Nestes valores deve-se considerar a utilização de toucinho nas formulações que contém alto teor de lipídeos, bem como principalmente a carne de origem ovina utilizada para a produção dos salames, a qual apresenta baixo teor de lipídeo na carne *in natura*, demonstrando que com todos os ingredientes, os resultados obtidos no produto final que se mantiveram dentro do padrão da legislação (BRASIL, 2000; FERRÃO, 2006; ZEOLA, 2004).

O teor de lipídeo pode variar na carne ovina devido alguns fatores intrínsecos e extrínsecos, responsáveis pela contribuição do sabor, textura e aparência dos produtos. Além disso, a gordura da carne apresenta características tamponantes, pois protege os microrganismos potencialmente probióticos nos salames das condições adversas do trato gastrintestinal (TABENELLI *et al*., 2012; VEDOVATTO *et al*., 2019). 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, próximo ao máximo exigido pela legislação (ROSELINO *et al*., 2018; INÔ, 2021).

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 (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 à inoculação de *Lactobacillus*, os quais necessitam de fonte de carboidrato para se desenvolver ao longo do tempo de vida útil do produto final. Entretanto, também se mostra elevado no embutido padrão S1, demonstrando que o processo de desidratação que ocorre durante a

etapa de maturação auxilia na concentração do produto seco contendo este macro nutriente.

Considerando os ingredientes obrigatórios, os resultados de carboidratos das diferentes formulações podem apresentar valores diferentes entre si, 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 *Lactobacillus*, 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 microrganismos potencialmente probióticos eleva consideravelmente o teor de carboidrato no produto final logo após o processo de maturação (ROSELINO *et al*., 2018).

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 SI, S2 e S3, tem-se 454,89; 483,76; 424,27kcal, respectivamente, o que demonstra uma baixa caloria nos produtos desenvolvidos para este trabalho, consequentemente mais aplicáveis em uma dieta para os consumidores que desejam controlar a quantidade de caloria ingerida por dia (TACO, 2011).

Tabela 5 - Composições físicas e físico-químicas de embutido fermentado tipo salame de carne ovina.

Análise	Ensaio		
	S1	**S2**	**S3**
Acidez (g/mL)	9,34 ± 0,08[b]	14,18 ± 0,04[a]	7,41 ± 0,07[c]
Textura (gF)	3000 ± 187[b]	3470 ± 597[b]	11990 ± 738[a]
Cor	L= 41,25 ± 0,53[b] a*= 12,53 ± 0,89[a] b*= 10,97 ± 0,65[a]	L= 35,77 ± 0,74 [c] a*= 10,66 ± 1,1[a] b*= 8,03 ± 0,66[b]	L= 50,27 ± 0,24[a] a*= 9,13 ± 0,22[a] b*= 11,79 ± 0,12[a]

Médias seguidas de mesma letra sobrescrita nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan a 95% de confiança
Ensaio S1: Salame padrão sem *Lactobacillus*.
Ensaio S2: Salame com *Lactobacillus casei.*
Ensaio S3: 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

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 estabelecidos pela legislação, entretanto pode-se evidenciar diferença estatística entre eles, sendo o Ensaio S2 inoculado de *Lactobacillus casei* o que apresentou a maior acidez, indicando uma maior produção de ácido láctico potencializada por esta cepa durante as etapas de fermentação e maturação. Em contrapartida, o resultado obtido pelo Ensaio S3 contendo *Lactobacillus paracasei* apresentou o menor valor de acidez, demonstrando desta forma, que esta bactéria não auxiliou de forma significativa as culturas iniciadoras da produção normal 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 *Lactobacillus* na composição mostraram valores que 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 cepas de *Lactobacillus*, apresetando resultados mais elevados quando comparados com os deste trabalho, o que pode ter acontecido devido ao tempo e temperatura de maturação, bem como o gênero do *Lactobacillus* inoculado (ROSELINO *et al*., 2018).

A força de cisalhamento é avaliada para medir a textura dos salames, parâmetro importante para a percepção sensorial do produto. Após o processo de maturação, os salames tendem a apresentar maior força de cisalhamento devido ao processo de secagem e reações bioquímicas que ocorrem durante esta etapa. Diante dos resultados obtidos, percebe-se diferença estatística apenas para o Ensaio S3, como descrito na Tabela 5. Este parâmetro está relacionado com a diferença de umidade e atividade de água entre eles, sendo o Ensaio S2 com menor força de cisalhamento e menor atividade de água e umidade, o que condiz com o resultado esperado. A queda de umidade implica em maior proteólise e consequentemente, maior maciez do produto final, ou seja, quanto maior a força aplicada, mais rígida a textura do produto e consequentemente 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 e 5,38 kgf, resultados próximos aos encontrados nos Ensaios 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 processo fermentativo. 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; coesividade e fraturabilidade, quanto mais duro o alimento, maior tende a ser a força necessária para que ocorra o rompimento do alimento (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. 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* para os três Ensaios, os quais demonstraram diferença significativa entre si e valores coerentes com a determinação de umidade e atividade de água, 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. Outros estudos apresentaram análises referentes até o dia 30 de armazenamento para três tratamentos, sendo eles também contendo culturas potencialmente probióticas, apresentando 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 S1 padrão, seguido do Ensaio com *L. casei* e *L. paracasei*. Considerando que o parâmetro a* não obteve diferença significativa entre os valores, bem como representa o índice da cor vermelha, demonstrando que o Ensaio S1 apresentou menor escurecimento da cor natural vermelha da carne. A literatura mostra valores próximos quando avaliam-se salames italianos, encontrando valores baixos, o que pode ser atribuído ao efeito do ácido lático nos diferentes estágios químicos da mioglobina, além disso, a oxidação do pigmento da carne é 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 maiores, consequentemente maior produção de ácido lático. Sendo assim, entende-se que a cepa potencialmente 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 encontrados valores elevados e com diferença estatística apenas para o Ensaio S2. Estes valores elevados podem ser correspondentes à 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, já que estas bactérias são capazes de produzir peróxido de hidrogênio, acelerando os processos de oxidação lipídica e a descoloração do salame, o que demonstra coerência ao maior valor encontrado para o Ensaio S3 contendo *L. paracasei* (GAO; LI; LIU, 2014). 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* (GAO, LI; LIU, 2014).

Segundo Macedo (2008), os embutidos devem permanecer 7 dias em câmara de fermentação e 21 dias em maturação, mantendo o controle na variação da temperatura e umidade de forma adequada afim de auxiliar no desenvolvimento das bactérias ácido-lácticas durante o processo de produção do salame, permitir que o pH, atividade de água e umidade alcancem o valor desejado conforme as legislações, parâmetros responsáveis pela textura e sabor característicos do produto final. Durante estas etapas os embutidos se mantiveram estáveis, com variações de cor e odor desejáveis.

6.2.1. Determinação de umidade e atividade de água

Os resultados das análises de umidade e atividade de água comparando-se o primeiro dia e o último de armazenamento estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 - Análises de umidade e atividade de água realizada nas amostras de embutidos fermentados tipo salame.

Ensaio	Umidade (%)		Aw	
	Dia 0	Dia 84	Dia 0	Dia 84
S1	42,71 ± 0,03^{aA}	44,54 ± 0,01^{aA}	0,957 ± 0,006^{aA}	0,926 ± 0,001^{aB}
S2	45,72 ± 0,04^{aA}	32,26 ± 0,03^{bB}	0,939 ± 0,00^{bA}	0,908 ± 0,004^{aB}
S3	41,01 ± 0,02^{aA}	38,03 ± 0,02^{abA}	0,948 ± 0,00^{abA}	0,932 ± 0,010^{aA}
Legislação	Máx. 40,00	Máx. 40,00	Máx. 0,92	Máx. 0,92

Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p<0,05$).
Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p<0,05$).
Letras iguais comparando verticalmente ou horizontalmente não diferem significativamente.
Ensaio S1: Salame padrão sem *Lactobacillus*.
Ensaio S2: Salame com *Lactobacillus casei.*
Ensaio S3: 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 diferença significativa, bem como não se encontram 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). Percebe-se também que os valores para os tratamentos S2 e S3 contendo *Lactobacillus*, mantiveram o teor de umidade fora do parâmetro da legislação, não se diferindo entre si significativamente, divergindo dos resultados obtidos em estudos com salames contendo cepas potencialmente probióticas, estando entre 32 e 35% no produto acabado obtido por Roselino *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). 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). Este autor sugere que os principais fatores que influenciam a elevada umidade, pode-se ter relação direta com o teor de umidade da carne *in natura*, que é acima de 70%, impactando nos produtos derivados, o controle dos parâmetros físicos e químicos e conservação do produto ao longo da vida útil, bem como a presença dos *Lactobacillus* mostrando impactar em um maior teor de umidade nos produtos finais. O que pode ter ocorrido neste trabalho é a não uniformidade da desidratação dos salames produzidos ou falha no registro e mensuração dos dados de umidade e temperatura do equipamento.

Após 84 dias de armazenamento, pôde-se avaliar nos resultados de umidade que os valores encontrados nos Ensaios S2 e S3 contendo *Lactobacillus* na composição, os quais não apresentaram diferença significativa entre si e apresentaram valores dentro do padrão estabelecido pela legislação de 40,00%, bem como próximos ao encontrado na TACO de 34,7% (TACO, 2011; BRASIL, 2000). Do mesmo modo, outros estudos 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 Ensaios S2 e S3 do presente trabalho também para embutidos fermentados de carne ovina (CASSOL, 2018).

Além disso, percebeu-se que os resultados demonstraram diferença estatística para os Ensaios S2 e S3 ao longo do tempo, os quais apresentaram uma queda considerável e uma elevação no Ensaio S1 final da vida de prateleira do produto, compreendendo então que a presença de cepas com alegações probióticas pode auxiliar na diminuição da 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. 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 S1 (MANUEL, 2014). Segundo Roselino *et al* (2018), os resultados de umidade demonstraram uma queda de 65,59% para

23,92% ao longo de 120 dias de vida de prateleira para formulação embutido fermentado inoculado de *Lactobacillus*, o que condiz com a redução de umidade presente no presente trabalho ao logo dos 84 dias.

Paralelo à umidade, um dos principais parâmetros a serem avaliados em derivados cárneos é a atividade de água. Pode-se observar na Tabela 6 que todos os valores de atividade água reduziram, mas mesmo assim estão acima do exigido como máximo pela legislação, exceto Ensaio S2 no dia 84, o que condiz com os resultados de umidade encontrados, visto que, quanto maior a umidade, maior a água livre avaliada pela atividade de água, tornando também o meio mais favorável ao crescimento microbiano (BRASIL, 2000). Diante disso, pode-se observar que os Ensaios S2 e S3 ao apresentarem uma queda nos valores de umidade, também apresentaram uma queda para atividade de água.

Avaliando os dois parâmetros ao longo do (após 84 dias de estocagem), nota-se que o cenário de atividade de água no produto também se modificou, tornando os resultados dos Ensaios S1 e S2 dentro dos padrões exigidos pela legislação de no máximo 0,92, os quais diferiram estatisticamente dos valores avaliados no tempo 0. Entretanto pôde-se avaliar a queda de atividade de água em todos os ensaios ao longo da estocagem, bem como percebeu-se que não houve diferença significativa nos três Ensaios para o tempo 84. Este resultado promove uma maior garantia da qualidade e segurança dos salames, demonstrando que ao longo do tempo a presença dos *Lactobacillus* auxilia na redução da presença de água disponível no meio o qual os microrganismos patógenos utilizam para se desenvolverem (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 *et al.* (2018) 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 potencialmente probióticas podem interferir no aumento da atividade de água do produto final.

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 0,92 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 a vácuo conforme recomendações (ROSELINO *et al*., 2018). Em trabalhos realizados com carne ovina para embutidos fermentados e culturas selecionadas com cepas potencialmente 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.

6.2.2. Determinação de pH

Os resultados das análises de pH estão descritos na Tabela 7, a qual pode-se observar que todas as amostras no tempo 0 (após maturação), demonstraram pH característico de salames.

Tabela 7 - Evolução ao longo do tempo do pH nas amostras de embutidos fermentados tipo salame

pH			
Dias/Ensaio	**S1**	**S2**	**S3**
0	$5,19 \pm 0,03^{aA}$	$5,02 \pm 0,02^{aB}$	$5,04 \pm 0,01^{aB}$
14	$5,35 \pm 0,01^{bA}$	$5,13 \pm 0,03^{bB}$	$5,20 \pm 0,01^{aA}$
28	$6,04 \pm 0,21^{cA}$	$5,11 \pm 0,01^{bB}$	$6,14 \pm 0,05^{bA}$
42	$6,03 \pm 0,17^{cA}$	$5,36 \pm 0,05^{cB}$	$6,44 \pm 0,35^{cC}$
56	$6,23 \pm 0,10^{dA}$	$5,28 \pm 0,01^{dB}$	$7,43 \pm 0,04^{dC}$
70	$6,47 \pm 0,06^{eA}$	$5,37 \pm 0,03^{cB}$	$7,64 \pm 0,08^{eC}$
84	$7,14 \pm 0,06^{fA}$	$5,53 \pm 0,03^{eB}$	$8,09 \pm 0,06^{fC}$

Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Duncan ($p<0,05$).
Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste de médias de Duncan ($p<0,05$).
Ensaio S1: Salame padrão sem *Lactobacillus*.
Ensaio S2: Salame com *Lactobacillus casei.*
Ensaio S3: 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.

De acordo com os dados ilustrados na Tabela 7, percebe-se uma tendência significativa de aumento do pH ao longo do tempo de armazenamento, exceto para o Ensaio S2. Naturalmente, 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*, o que presume-se que esta cepa encontra-se em período de desenvolvimento em sua fase *lag*. Para o Ensaio S3 que contém *Lactobacillus paracasei*, demonstra-se que a cepa não apresenta o mesmo tempo de fase *lag* no meio cárneo que o Ensaio S2, obtendo resultados diferentes significativamente após 28 dias. O pH final dos embutidos pode variar entre 4,6 a 6,2, dependendo de fatores como a velocidade de acidificação das culturas iniciadoras. Valores mais altos de pH podem ser indícios de que o processo de fermentação não foi efetivo; são responsáveis por formar peptídeos, aminoácidos e compostos nitrogenados, bem como tornam o ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos patógenos, o que ocorre após 56 dias do Ensaio S1 e após 42 dias do Ensaio S3 (SONG *et al*., 2018; GOMES, 2020).

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. Além disso, pode-se observar que os três ensaios apresentaram diferenças significativas tanto entre eles, quanto ao longo do tempo de estocagem, o que demonstrou a coerência da curva microbiana em suas quatro fases, finalizando com o pH mais elevado, o que indica o declínio do desenvolvimento dos microrganismos inoculados. O acompanhamento do pH é de extrema importância para avaliar a estabilidade do produto, pois 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).

Roselino *et al*. (2018), 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 Ensaios S1, S2 e S3 desta pesquisa. Os menores valores obtidos ocorreram durante os primeiros 28 dias de armazenamento para o Ensaio S2 e nos primeiros 14 dias para os Ensaios S1 e S3, apresentando nestes períodos diferença significativa apenas para o Ensaio S2. Os valores de pH foram comparados ao longo dos 84 dias de armazenamento demonstrando diferença significativa nos três Ensaios.

As formulações dos Ensaios S1 e S3 apresentaram os maiores valores, mostrando o quanto se elevaram durante a vida útil, e consequentemente obtiveram uma queda na produção de ácido láctico a partir do primeiro mês de estocagem, o que não favorece o crescimento de bactérias potencialmente probióticas. Isto indica que o *Lactobacillus paracasei* presente no Ensaio S3 não auxiliou na atividade fermentativa de forma eficiente por mais de 28 dias, demonstrando diferença estatística em seus resultados a partir deste período. O mesmo aconteceu em outro estudo de embutidos fermentados que elevaram o pH durante o processo de armazenamento por 120 dias (ROSELINO *et al*., 2018). 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 a fim 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 Ensaios S1 e S3, os quais não podem garantir a segurança e qualidade empregada a estas formulações a partir de dia 42 de estocagem para S3 e 56 dias para S1, mesmo somados ao fator de temperatura baixa de armazenamento (BIASUZ, 2018). Em pesquisas realizadas utilizando culturas potencialmente 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, indicando que a presença de culturas com alegações probióticas auxiliam as culturas iniciadoras na redução do pH, sendo este resultado conforme apenas para o Ensaio S2 deste trabalho (MACEDO *et al*., 2008).

Durante o período de *shelf-life* destas amostras, pode-se observar o pH mais elevado no 84° dia principalmente no Ensaio S3. A variação deste pH está relacionada com a multiplicação de BAL, sendo assim, pode-se afirmar que no período de 84 dias o Ensaio S1 e S3 não continuaram apresentando pH reduzido, com diferenças significativas ao longo do tempo e entre o Ensaio S2, o qual foi o único que manteve pH reduzido conforme desejado podendo, desta forma, garantir um alimento apto e seguro para o consumo durante os 84 dias de estocagem.

6.3. 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 n°60 (BRASIL, 2019), como descritos nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Avaliação microbiológica realizada na amostra de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina no tempo 0 após maturação

Ensaio	*Escherichia coli* (UFC/g)*	*Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g)*	*Salmonella* em 25g (UFC/25g)**
S1	<1,00 x 10^1	<1,00 x 10^1	Ausência***
S2	<1,00 x 10^1	<1,00 x 10^1	Ausência***
S3	<1,00 x 10^1	<1,00 x 10^1	Ausência***
Legislação****	<2,00 x 10^1	<1,00 x 10^2	Ausência***

Ensaio S1: Salame padrão sem *Lactobacillus*.
Ensaio S2: Salame com *Lactobacillus casei.*
Ensaio S3: 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 n°60 de 2019 (BRASIL, 2019).

Fonte: Autor, 2022.

Tabela 9 - Avaliação microbiológica realizada na amostra de embutidos fermentados tipo salame de carne ovina no tempo 84

Ensaio	*Escherichia coli* (UFC/g)*	*Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g)*	*Salmonella* em 25g (UFC/25g)**
S1	<1,00 x 10^1	<1,00 x 10^1	Ausência***
S2	<1,00 x 10^1	<1,00 x 10^1	Ausência***
S3	<1,00 x 10^1	<1,00 x 10^1	Ausência***
Legislação****	<2,00 x 10^1	<1,00 x 10^2	Ausência***

Ensaio S1: Salame padrão sem *Lactobacillus*.
Ensaio S2: Salame com *Lactobacillus casei.*
Ensaio S3: 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 n°60 de 2019 (BRASIL, 2019).

Fonte: Autor, 2022

Nos ensaios microbiológicos realizados no presente trabalho, a presença de *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase postiva* 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. Com isso, pode-se perceber para os Ensaios S2 e S3 o auxílio bioconservante que os *Lactobacillus* apresentaram durante o armazenamento dos embutidos. Este auxílio também pode ser influenciado pelo pH do produto menor que 6,2 até o tempo 42 para S3 e durante os 84 dias para S3, que apesar do salame apresentar elevada umidade e atividade de água, é possível evitar a deterioração do alimento, controlando estes fatores para melhorar sua qualidade e evitar 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, representando 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, assegurando desta forma a qualidade do produto final. Além disso, este gênero *Staphylococcus* pode apresentar uma queda de crescimento quando há presença dos gêneros *Lactobacillus* se desenvolvendo no mesmo, bem como apresenta um pH ótimo de crescimento entre 7,0 a 7,5; com isso, pode-se avaliar que ao longo do tempo de vida útil para os 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, conhecidos como salmonelose. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos de embutidos fermentados apresentando cultura *starter* na composição como também culturas potencialmente probióticas, 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).

Como indicativo das condições higienicossanitárias 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*, assim como no presente trabalho o qual o resultado se mostrou abaixo da legislação vigente, demonstrando desta forma que a presença de cepas com alegações probióticas influencia na inibição deste patógeno, mantendo um produto final íntegro com garantia de qualidade e segurança para o consumo (BIS-SOUZA *et al*., 2020; GOMES, 2020).

6.4. CONTAGEM DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS

Durante o processo de produção dos embutidos fermentados foram acompanhadas as contagens iniciais para inoculação dos *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* sendo as mesmas introduzidas na formulação contendo número de células viáveis de 10^7 UFC/g, tanto para o *L. paracasei,* quanto para o *L. casei*.

As análises de contagem de ambas as bactérias ácido-lácticas também foram realizadas ao longo dos 84 dias de armazenamento. Os resultados obtidos através destas análises nos Ensaios S2 e S3 de embutidos fermentados tipo salame contendo *Lactobacillus* estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Contagem de bactérias ácido-lácticas ao longo do *shelf-life* dos embutidos fermentados tipo salame

Contagem bactérias ácido-lácticas (UFC/g)		
Dias/ Ensaio	**S2**	**S3**
0*	$1,61 \times 10^{10}$	$3,37 \times 10^{11}$
30*	$1,64 \times 10^{13}$	$5,40 \times 10^{8}$
44	$4,00 \times 10^{7}$	$4,30 \times 10^{10}$
58	$1,35 \times 10^{15}$	$4,52 \times 10^{13}$
72	$4,52 \times 10^{13}$	$1,12 \times 10^{13}$
86	$1,20 \times 10^{8}$	$3,19 \times 10^{7}$
100	$1,82 \times 10^{7}$	$6,80 \times 10^{7}$
114	$2,30 \times 10^{7}$	$1,10 \times 10^{7}$

*0: Viabilidade de BAL no momento da inoculação na massa produzida.
*30: Viabilidade de BAL logo após a maturação do salame.
Ensaio S2: Salame com *Lactobacillus casei.*
Ensaio S3: Salame com *Lactobacillus paracasei.*

Fonte: Autor.

De acordo com a Tabela 10, observa-se 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 10^7 UFC/g, os quais conforme a legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008) corresponde à quantidade mínima de microrganismos com alegações probióticas ativos e viáveis, os quais devem ser entre 10^7 e 10^9UFC/g para que o produto tenha a alegação de funcional a fim de promover com eficiência seus benefícios.

A inoculação do gênero *Lactobacillus* nos embutidos fermentados pode auxiliar na inibição do desenvolvimento de culturas bacterianas patogênicas. Antes da maturação, logo após o embutimento, os salames apresentaram contagem acima de 10^7 UFC/g o que permitiu serem considerados potencialmente 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 com alegações 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 esta viabilidade até o dia 84 e completando desta forma o *shelf-life* sendo considerados produtos funcionais potencialmente probiótico.

A contagem do número de células viáveis dos microrganismos com alegações probióticas *L. casei* e *L. paracasei* aumentou gradativamente após a etapa de maturação e após os primeiros 14 dias produzidos, demonstrando assim, a atividade e ação dos mesmos ao longo desse tempo em quantidades viáveis. Nos 14 primeiros dias as amostras apresentaram uma contagem na ordem de 10^7 e 10^{10} UFC/g 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/g para *L. casei* e *L. paracasei*, respectivamente, o que se deve 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 à fase de estabilização e declínio com 1,82 x 10^7 e 6,8 x 10^7 UFC/g, onde os *Lactobacillus* 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 14° ao 70° dia de armazenamento.

Dessa forma os embutidos garantem os microrganismos benéficos 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 à acidez, ocorreu um decréscimo no seu número analisados sob condições ácidas, porém não o suficiente para torná-los inativos de suas funções potencialmente probióticas. A sobrevivência destas bactérias em produtos fermentados depende de diversos fatores, tais como interação entre as espécies presentes no alimento, condições de cultura, composição química do meio, pH e acidez do produto, temperatura de incubação e tempo e temperatura de estocagem (SILVA, 2016; OLIVEIRA *et al*., 2021). Entretanto, mesmo com variação de pH, 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 acidophillus* no fim da maturação valores de 10^8 UFC/mL, após 90 dias de estocagem as formulações exibiram redução na população de *Lactobacillus spp* (ROSELINO *et al*., 2018).

Macedo e colaboradores (2008) avaliaram três cepas de *Lactobacillus spp*, em associação com culturas iniciadoras comerciais, para a produção de salame potencialmente probiótico, utilizando *L. paracasei, L. rhamnosus e L. casei,* as quais no final do período de maturação foi de 9,50 x 10^7; 5,50 x 10^7 e 3,45 x 10^7 UFC/g, respectivamente. Estudos com *L. rhamnosus* e L. *paracasei* verificaram que estas cepas com alegações probióticas se desenvolveram em salames, obtendo população de células viáveis de 10^7 UFC/g no final do período de armazenamento (COMAM *et al*., 2012), resultados próximos ao encontrados no final do período de estocagem do presente estudo. 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 potencialmente probióticos observada, uma ingestão diária superior a 10 g dos embutidos fermentados com alegações probióticas seria suficiente para respeitar as recomendações da ANVISA e para que os possíveis efeitos benéficos à saúde sejam observados.

6.5. APLICAÇÃO DOS MODELOS MATEMÁTICOS

Os dois modelos matemáticos escolhidos para aplicação envolvem um foco maior para explicações biológicas, gerando o que mostra nas equações 21 e 22 a seguir, de BAR e GOM, respectivamente.

$$y = y_0 + mx + ln.e^{-mx} + e^{-h} - e^{-mx-h} \quad (21)$$

$$y = c.e^{-e^{-b(x-m)}} \quad (22)$$

Onde para ambas as equações, y é a variável de contagem de bactéria ácido lática (log_{10}) que possui relação direta com o tempo (x) que deve ser medido em horas.

Estas equações são consideradas mais completas e complexas que outras, e por este motivo costumam ajustar os dados de forma mais precisa, principalmente o modelo BAR. Diante disto, os valores da contagem do crescimento das bactérias ácido-lácticas ao longo do tempo foram aplicados no software MicroFit para as modelagens, conforme são demostrados a seguir.

6.5.1. Cinética das bactérias ácido-lácticas

Os dados durante o período de armazenamento em horas obtido a partir contagens das bactérias ácido-lácticas do *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* nos embutidos fermentados tipo salame de carne ovina, encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Cinética de bactérias ácido-lácticas dos embutidos fermentados em horas

Contagem bactérias ácido-lácticas ($\log_{10}$UFC/g)		
Horas/ Ensaio	**S2**	**S3**
0*	10,21	11,53
720*	13,21	8,73
1056	7,60	10,63
1392	15,13	13,65
1728	13,65	13,05
2064	8,08	7,83
2400	7,36	7,50
2736	7,26	7,04

*0: Viabilidade de BAL no momento da inoculação na massa produzida.
*720: 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 da Tabela 11 aplicou-se os mesmos ao software MicroFit para o modelo GOM e ao software DMfit para o modelo BAR, 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 12 para o *L. casei* e para o *L. paracasei*, bem como a comparação dos dados obtidos experimentalmente e através das funções dos modelos estão dispostos nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 12 - Parâmetros estabelecidos a partir da equação do modelo de Baranyi e Roberts e modelo de Gompertz para os embutidos fermentados

Modelo	Ensaio	Parâmetros das equações			
		Y0	**m**	**h**	
Baranyi e Robert	**S2**	11,78	1766,58	0,00	
	S3	11,36	1747,43	0,00	
		a	**b**	**c**	**m**
Gompertz	**S2**	10,21	13,29	0,12	13,29
	S3	11,53	8,96	-1,75	8,96

Ensaio S2: Salame com *Lactobacillus casei.*
Ensaio S3: Salame com *Lactobacillus paracasei.*

Fonte: Autor.

Tabela 13 - Dados experimentais ajustados pelos dois modelo de Baraniy e Roberts Gompertz para *L. paracasei*

		Baraniy e Roberts		**Gompertz**	
X	**Y**	**Y(Modelo)**	**Erro (%)**	**Y(Modelo)**	**Erro (%)**
0	11,53	11,36	1,50%	11,53	0,00%
720	8,73	11,36	23,15%	9,77	10,74%
1056	10,63	11,35	6,34%	9,77	8,69%
1392	13,66	11,32	20,58%	9,77	39,57%
1728	13,05	10,97	18,96%	9,77	33,44%
2064	7,83	9,55	18,01%	9,77	19,94%
2400	7,50	7,89	4,94%	9,77	23,31%
2736	7,04	6,17	14,10%	9,77	28,02%

Fonte: Autor.

Tabela 14 - Dados experimentais ajustados pelos dois modelo de Baraniy e Roberts Gompertz para *L. casei*

		Baraniy e Roberts		Gompertz	
X	**Y**	**Y(Modelo)**	**Erro (%)**	**Y(Modelo)**	**Erro (%)**
0	10,21	11,78	13,33%	10,21	0,00%
720	13,21	11,78	12,18%	10,31	27,93%
1056	7,60	11,77	35,43%	10,31	26,43%
1392	15,13	11,72	29,10%	10,31	46,47%
1728	13,65	11,05	23,53%	10,31	32,14%
2064	8,08	9,86	18,05%	10,31	21,78%
2400	7,36	8,05	8,57%	10,31	28,75%
2736	7,26	6,16	17,86%	10,31	29,72%

Fonte: Autor.

Ao observar os valores dos erros para o *L. paracasei,* analisando a Tabela 13, obteve-se resultados melhores para o modelo de Baranyi e Roberts, com um Erro médio de 13,45%, o que demonstra um valor ainda não ideial desejado para uma adequação eficiente do modelo matemático em relação ao crescimento das bactérias ácido-lácticas. Entretanto, quando comparado com o modelo de Gompertz, observa-se um Erro médio mais elevado de 20,46%, o que demonstra que o crescimento microbiano não obteve uma adequação a este modelo matemático, evidenciando um melhor ajuste aplicado para o Baranyi e Roberts aplicados para ambos *Lactobacillus* neste estudo.

Ao avaliar outro produto cárneo Mezaroba et al (2016), verificou que, em filé de peito, o modelo primário que melhor se adequou também foi o BAR, o qual representouuma maior eficácia nos dados de estudo sobre *B. thermosphacta*, assim como demonstrado neste trabalho. Com isto, pode ressaltar que a predição utilizada para as bactérias ácido-lácticas no modelo de BAR é mais confiável para ser utilizadas em produtos alimentícios cárneos e pode ser considerado seguro em estudos de outras bactérias.

Para o *L. casei*, ao observar os valores dos erros a partir da Tabela 13, pode-se avaliar resultados melhores para o modelo de Baranyi e Roberts, os quais também demonstraram Erro médio menor (19,76%) do que quando

comparado com o modelo de Gompertz (26,75%), indicando uma melhor adequação 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 apresentou valores de erros elevados e identifica que o crescimento microbiano não obteve uma boa adequação a este modelo matemático primário.

Estas divergências apontadas de adequações demonstraram o ineficiente ajuste do modelo de Gompertz para ambos *Lactobacillus*, entretanto, os resultados e gráficos gerados deste modelo para o *Lactobacillus casei* foram desconsiderados devido ao elevado Erro médio e R^2 igual a 0. Estes valores indesejados demonstram que não houve nenhuma adequação do modelo durante o crescimento bacteriano, principalmente devido aos valores dispersos ao longo do tempo apresentados nesta cepa potencialmente probiótica.

Porém, para os demais resultados, foram gerados os ajustes das adequações aos modelos, os quais podem ser percebidos a partir das Figuras 6, 7 e 8.

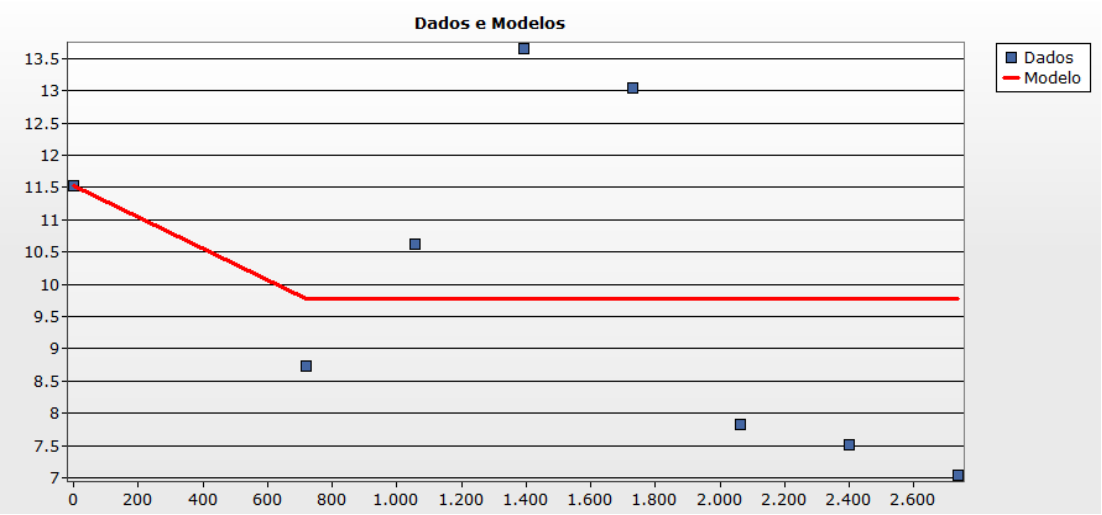


Figura 6 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Gompertz para *L. paracasei*
Onde o eixo x é o tempo em horas de processamento e o eixo y a contagem em log_{10} UFC/g.

Fonte: Autor.

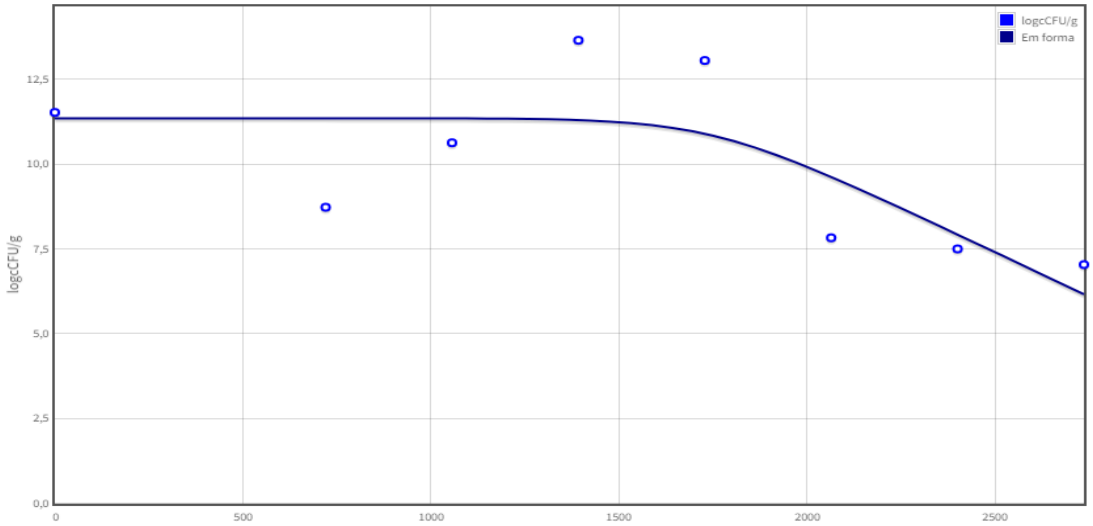


Figura 7 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Baranyi e Roberts para *L. paracasei*

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

Fonte: Autor.

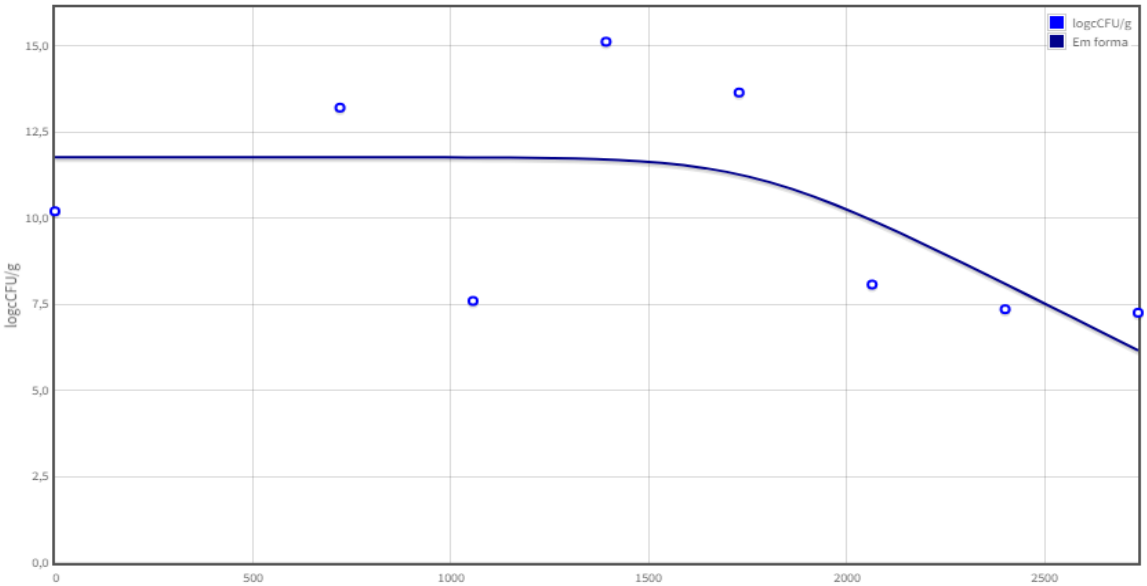


Figura 8 - Curva do ajuste do modelo matemático primário de Baranyi e Roberts para *L. casei*

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

Fonte: Autor.

Para os ajustes feitos para as BAL a partir dos modelos propostos, os resultados das curvas estão apresentados nas figuras 6 e 7 para *L. paracasei* e 8

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 potencialmente probióticas, demonstrando que o modelo proposto não foi adequado nem eficiente para estes crescimentos microbianos. Os pontos mais dispersos ao longo do curso foram responsáveis por comprometerem a exatidão dos parâmetros do método e consequentemente seu ajuste matemático.

Para o modelo proposto de Baranyi e Roberts, os ajustes se apresentaram mais adequados para os tipos de cepas inoculadas no produto, visto que os mesmos se adequaram principalmente nas fases *log* e de declínio do crescimento de ambos os microrganismos, compreendendo uma diferença nas fases de crescimento entre os microrganismos com alegações probióticas. Avaliando os comportamentos dos microrganismos, pôde-se perceber que para o *L. paracasei* no tempo 0, obteve uma queda nas células viáveis até o tempo 720, as quais as fases dos *Lactobacillus* seguiram um crescimento na fase *log* até o tempo 1056, seguido da fase estacionária que no tempo 1728 decaiu iniciando a fase de declínio. Na avaliação para o *L. casei*, notou-se um comportamento contrário no tempo 0, visto que as cepas iniciaram com menos células viáveis quando comparado ao tempo 720 depois da maturação, entretanto as outras etapas de desenvolvimento microbiano foram semelhantes ao *L. paracasei*, o qual iniciou sua fase *log* a partir do tempo 1056, fase estacionário no tempo 1392 e fase de declínio no tempo 1728.

Oliveira (2021) obteve resultados de crescimento elevado na fase *lag* para produtos cárneos durante as primeiras horas, indicando melhor ajuste no modelo de BAR, assim como no presente trabalho. Diante do exposto, entende-se que o tempo de desenvolvimento para ambos os microrganismos foram os mesmos, com um período de fase *log* que durou 1056 horas, se mantendo ativos até o final do prazo de validade, porém com início da fase de declínio no tempo 1728. Sendo assim, estes primeiros 42 dias de armazenamento após maturação, seriam o prazo final ideal para o consumo destes embutidos fermentados a fim de obter os benefícios que os *Lactobacillus* inoculados oferecem, sem obter riscos à saúde devido pH elevado a partir deste período. Ao avaliar outro produto cárneo, um estudo em filé de peito, o modelo primário que melhor se adequou também foi o

de BAR, se mostrando com uma maior eficácia nos ajustes dos dados (MEZAROBA *et al*., 2016).

Diante do exposto, ao avaliar 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 *Lactobacillus* adicionados 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. Apesar da não adequação desejada no modelo Baranyi e Roberts, pode-se perceber uma melhor adequação do mesmo às cepas microbianas quando comparado ao modelo de Gompertz.

6.6. 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 *L. casei* e *L. paracasei* ao longo do tempo de 84 dias de estocagem dos embutidos fermentados, e estão dispostos nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15 - 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	1,17	1,17	9,14	0,00
Baranyi e Roberts	1,15	1,15	5,64	0,15

Fonte: Autor.

Tabela 16 - 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	1,16	1,16	5,50	0,06
Baranyi e Roberts	1,14	1,14	2,63	0,35

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 *Lactobacillus* durante o tempo de vida de prateleira após maturação, totalizando 84 dias, estão apresentados nas tabelas 15 e 16. Os valores de R^2 mais próximos a 1 indicam melhor desempenho do modelo, bem como valores de RMSE mais 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 maiores 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 destas 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 mais próximo a 0, que o modelo de Baranyi e Roberts apresentou melhor capacidade de ajuste para ambos *Lactobacillus* aos valores experimentais quando comparado ao modelo de Gompertz para as mesmas condições de armazenamento e diluições aplicadas, entretanto com melhores valores definidos pelos ajustes no *Lactobacillus paracasei*. Diante disto, pode-se confirmar 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, as composições do alimento, condições ambientais, estado das cepas 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 dos ajustes 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. Tendo em vista que o software DMfit utilizado para o modelo de BAR indicou o modelo binário como uma opção de ajuste matemático, mostrando um R^2 mais elevado. Estudos revelam testes dos modelos de Baranyi e Roberts aos dados do crescimento de *L. viridescens*e 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 (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. Apesar do modelo de Baranyi e Roberts também não apresentarem valores ideias desejados, representou um melhor ajuste devido ao R^2 e fator de exatidão com valores mais próximos de 1 e RMSE mais próximo a 0, quando comparado com modelo de Gompertz.

7. CONCLUSÃO

Os embutidos fermentados tipo salame apresentaram, de forma geral, características físico-químicas e físicas de acordo com a legislação brasileira, exceto para as análises de umidade, atividade de água e carboidratos, os quais não obtiveram valores dentro dos padrões da legislação, principalmente devido à formulação do produto e inoculação dos *Lactobacillus* que influenciaram na elevação destes parâmetros.

Em relação aos resultados microbiológicos, os três Ensaios apresentaram ausência de microrganismos patogênicos exigidos de acordo com a legislação vigente para embutidos fermentados tipo salame, garantindo desta forma um alimento isento de contaminações destes microrganismos avaliados, os quais podem causar risco à saúde. Entretanto, devido ao elevado pH durante o armazenamento dos Ensaios S1 e S3, o ambiente tornou-se propício para o desenvolvimento de outras espécies de patogênicos, impedindo de garantir a segurança do consumo dos mesmos após 42 dias de estocados.

A contagem de BAL realizada durante 84 dias após maturação, demonstrou que os embutidos inoculados de cepas potencialmente probióticas *L. casei* e *L. paracasei*, apresentaram células viáveis na ordem de no mínimo 10^7 UFC/g até o final do prazo de validade, atendendo o requisito da norma IN n°46/2007, para cepas potencialmente probióticas ativas, trazendo benefícios funcionais para o alimento, além da ação de auxílio na conservação do produto evitando o aparecimento de microrganismos patogênicos.

A aplicação dos modelos matemáticos Baranyi e Roberts e Gompertz, mostraram um ajuste mais adequado para ambas as cepas bacterianas apenas para a função de BAR, devido aos fatores R^2 e fator exatidão se encontrarem mais próximos de 1, bem como ao RMSE maior próximos de 0, garantindo o melhor ajuste e predição do modelo aos dados encontrados. Porém, este resultado para o modelo de BAR, ainda não demonstrou ajuste suficiente capaz de concluir e garantir a viabilidade dos microrganismos potencialmente probióticos inoculados ativos por 84 dias nos embutidos fermentados.

8. 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. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v.18, n.2, p.205-210, 1998.

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

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**, p. 238, 2006.

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

APHA. American Public Health Association. **Standard methods for the examination ofwater and watwater. 21 Ed**, 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, cap. 19, 2012.

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 OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC**. Official Methods of Analysis. 18 Ed**, p. 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. 3 Ed**, p.1-66, 2004.

AZEVEDO, M. M. R.; VASCONSCELOS, V. R.; ABDALLA, A. L. et al. Mathematical models to estimate the cashew tree false fruit ruminal fermentation kinetic through the semi-automatic in vitro gas production technique. **Brazilian Journal of Development**., v. 6, n. 9, p. 73534-73549, 2020.

AZNAR, R.; ZUÑIGA, M. ¿Qué son las bacterias lácticas? **Instituto de Agroquímica y Tecnología de alimentos**, p. 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.; TODOROV, S. D.; JURKIEWICZ, C. H. 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, J. R. W. C. **Ensino-aprendizagem com modelagem matemática: uma nova estratégia**, 2011.

BATY, F.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. Estimating the bacterial lag time: wich model, which precision. **International Journal Food Microbiology**, 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. **Revista Contexto e Saúde**, v. 11, p. 16-24, 2011.

SLIMA, B. S.; KTARI, N.; TRIKI, M. et al. Effects of probiotic strains, *Lactobacillus plantarum* TN8 and *Pediococcus acidilactici*, on microbiological and physico-chemical characteristics of beef sausages. **Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie**, v. 92, p. 195-203, 2018.

BENDALI, F., MADI, N., SADOUN, 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. LIAMAS, M. G.; IRAPORDA, C. 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.** 2 Ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 616, 2011.

BERKEL, B. M. V.; BOOGAARD, B.V.D.; HEIJNEN, C. Conservação de peixe e carne. **Wageningen, Países Baxos: 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**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Gradiuação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p. 141, 2010.

BIASUZ, T. **Obtenção de espécies de *Lactobacillus* microecapsulado em carragena com combinação proteica e aplicação em salame tipo milano. Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.Universidade de Tecnológica Federal do Paraná. 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.

BIS-SOUZA, C. V.; PENNA, A. L. B.; BARRETO, A. C. S. Applicability of potentially probiotic *Lactobacillus casei* in low-fat Italian type salami with added

fructooligosaccharides: in vitro screening and technological evaluation. **Meat Science**. p. 168, 2020.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 911, p. 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 n° 9.013, de 29 de março de 2017, regulamenta a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei n° 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. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 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.

BRASIL. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução RDC n°2 de 7 de janeiro de 2002. Cria o Regulamento Técnico de Substancias 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 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. **Ministério da Agricultura**. Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de industrializados cárneos. Instrução Normativa n° 4 de 31 de março de 2000. Diário Oficial da União, Brasília, 05/04/2000, n°6, 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 n° 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 de 3 de Agosto de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do hambúrguer. Diário Oficial da União, DF, 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 n° 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. 2ª Ed**., v. 2, 2015.

BURIN, P. C.; FUZIKAWA, I. H. S.; SOUZA, K. A.; FERNANDES, A. R. M.; GOES, R. H. T. B. Nutraceutical characteristics of meat and its importance in the human feeding. 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. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57(4), p. 373-80, 2007.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médicine et Meladies 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*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57 (1), p. 51-56, 2007.

CARDARELLI, H. R. Inulin and oligofrutose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. **LWT - Food Science and Technology**, 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. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 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. Programa d Pós-Graduação e, 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**, v. 1(1), p. 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.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, p. 118, 2010.

CARVALHO, M. **Isolamento e caracterização de bacteriocinas com potencial interesse na área alimentar**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal. 2015.

CASABURI, A.; BLAIOTA, G.; MAURIELA, G. et al. Technological activities of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* strains isolated from fermented sausages. **Meat Science**, 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*. Trabalho de Conclusão de Curso de graduação em 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**, p. 11, 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. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Zootecnia.Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Portugal, p. 74, 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 xylosus*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná, 2004

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 Science and Technology**, v. 30, p. 171-179, 2010.

COELHO, F. J. O.; QUEVEDO, P. S.; MENIN, A.; TIMM, C. D. Avaliação do prazo de validade do iogurte. **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 SYNBIO®, a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.346–352, 2012.

COSTA, A. C. C. C. **Isolamento de Bactérias Láticas Produtoras de Bacteriocinas e Avaliação de sua Atividade Frente a Patógenos Alimentares em Sistema de Bioconservação de Produto Lácteo**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, p. 68, 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**,** 2017.

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**, 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. **Biotecnologia ciência e Desenvolvimen**to, v.29, p.114-119, 2003.

DE VUYST, L.; FALONY, G.; LEROY, F. Probiotics in fermented sausages. **Meat Science**, 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.; KANDYLIS, P.; PETROVIC, T. 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, 2016.

DUBEY, V.; GHOSH, A. R.; BISHAYEE, K.; KHUDA-BUKSH, A. R. Appraisal of the anti-cancer potential of probiotic *Pediococcus pentosaceus* GS4 against colon cancer: in vitro and in vivo approaches. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 66-79, 2016.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos. 2 Ed**, p. 2010, 2017;

ERTÜRKMEN, P.; KILIC, G.; KILIC, B. Use of lactic acid bacteria and probiotics in meat products. **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. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Administração de Negócios; MBA em Gestão do Agronegócio. Universidade Federal do Paraná, p. 31, 2017.

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.121131, 2011.

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

FERNANDES, E. N. BOTELHO, L. G.; FALCÃO, J. P. M. et al. Enumeration and antagonist activity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian yogurts. **Jounal Cietific Univiçosa**, v.7, 2015.

FERRÃO, S. P. B. **Características morfométricas, sensoriais e qualitativas da carne de cordeiros**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação “Stricto Sensu” em Ciência dos Alimentos Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2006.

FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção**. Editora: Rubio, 2012.

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

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

FORSYTH, E. S. J.; HAYES, P. R. Food hygiene, microbiology and HACCP. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2 Ed., v. 2, p. 82 142, 2013.

FREITAS, E. R.; RABELLO, C. B.; WATANABE, P. H. Probióticos e Prebióticos na Nutrição de Monogástricos. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p. 485-510, 2014.

FELDMAN, V. **Avaliação de linhagens de bacterianas obtidas a partir de kefir como cultura iniciadora para produção de embutido cárneo fermentado**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação 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 *Lactobacillus* encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 482-489, 2015.

GARCIA, I. F. F.; LEOPOLDINO JUNIOR, I. Influência do manejo produtivo na qualidade da carne caprina e ovina. Programa de Pós-Graduação Doutorado em Zootecnia. Universidade Federal de Lavras, 2018.

GASPAR, P.; CARVALHO, A. L.; VINGA, S. 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.; BARANYI, J.; PITT, J. I. et al. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n. 3-4, p.419-431, 1994.

GEITENES, S.; OLIVEIRA, M. F. B.; KALSCHNE, D. L. et al. Modelagem do crescimento de bactérias láticas e análise microbiológica em apresuntado e presunto cozido e embalado a vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, p. 113- 133, 2013.

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

GOMES, B. O. Aplicação e viabilidade de probiótico (*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) microencapsulado em embutido fermentado tipo salame. Dissertação de 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**. 7° 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. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 115, p. 513-585, 1825.

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

GRANADOS, C.; GUZMAN, L.; ACEVEDO, D. Análisis proximal, sensorial y de textura de salchichas elaboradas con subproductos de la industria procesadora de atún (*Scombridae thunnus*). **Información Tecnológica**, v. 24, p. 29-34, 2013.

HAMES, W. P.; HALLER, D.; GÄNZLE, M. G. Fermented Meat. In: FARNWORTH, E. R. Handbook of Fermented Functional Foods. **Boca Raton. 2 Ed**, p. 291-351, 2008.

DARAGH, C.; SUGRUE, I.; TOBIN, C. et al. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

HLEAP, J. I.; VELASCO, A. V. 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**, v. 8, p. 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 C. N.; MORGANO, M. A.; CELEGHINI, R. M. S. et al. 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**, v. 89, p. 426-433, 2011.

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**, v. 23, p. 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 + Technology**, v. 69, p. 185-190, 2016.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos** 4° Ed. São Paulo, v. 1, 2008.

KALSCHNE, D. L.; GEITENES, S.; VEIT, M. R. et al. Growth Inhibition of Lactic Acid Bacteria in Ham by Nisin: A Model Approach. **Meat Science**, v. 98, p. 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.; TEICHRIEB, M.; NESELLO, M.; LOPES, W.; MATTANNA, P. Desenvolvimento de salame probiótico fermentado com microcápsulas contendo *Lactobacillus paracasei paracasei*. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**, p. 18, 2017.

KWON, D. L. Scientific knowledge in traditional fermented foods. **Journal of Ethnic Foods**, v. 5(3), p. 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. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, 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)**, v. 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**, v. 57(6), p. 971-978, 2014.

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

LYOCARNI – Culturas para aplicações em carne. **Campinas: Sacco**, 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**, 2008.

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

MAFRA, J. F.; CRUZ, A. I. C.; SANTANA, T. S. et al. Probiotic characterization of a commercial starter culture used in the fermentation of sausages. **Food Science and Technology**, 2020.

MANUEL, A. J. A. **Novo produto transformado- Caracterização físico química de pernas curadas de carne ovina e caprina**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia da Ciência Animal. 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, p. 1-7, 2014.

MARTINS, I. B. A.; DELIZA, R.; SANTOS, K. M. O.; WALTER, E. H. M.; MARTINS, J. M.; RESENTHAL, A. Viability of probiotics in goat cheese during storage and under simulated gastrointestinal conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 853-863, 2018.

McMEEKIN, T. A., ROSS, T. Predictive microbiology: provinding a know ledge-based framework or change management**. International Journal of 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**, v. 10(1), p. 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.; MANAL, M.; KERGORDAY, G. et. al. ***Lactobacillus salivarius***: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 296-304, 2013.

MEZAROBA, M. E. P.; LONGHI, D. A.; VEDOVATTO, E. et al. Estimativa da vida útil e dos parâmetros de crescimento de bactérias ácido-lácticas em filés de peito de frango resfriados embalados a vácuo e com atmosfera modificada. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 34, n 1, p. 1-14, 2016.

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.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **The Journal of Pediatrics**, 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.; KHALESI, S.; COLSON, N. 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.; FIGUEIREDO JUNIOR, C. A.; YAMOTO, A. et al. Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos no Nordeste. **Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil**, p. 128, 2010.

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. Colostro humano: fonte natural de probióticos. **The Journal of Pediatrics**, v. 77(4), p. 265-210, 2001.

NUNES, A. S.; OLIVEIRA, A. N.; COSTA, J. C. C. P. et al. Modeling the growth of S*almonella spp*. In broiler meat stored at different temperature conditions. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.9, p. 91163-91175, 2021.

OLIVEIRA, A. N. Modelagem matemática do crescimento de **Brochothrix thermosphacta** em presunto cozido, fatiado e embalado a vácuo. Trabalho de conclusão de curso da Graduação em Tecnologia em Alimentos. Instituto Federal Goiano, Morrinhos, 2021.

OLIVEIRA, G. L.; NASCIMENTO, C. A.; BENEVENUTO JUNIOR, A. A. et al. Salames elaborados com a utilização de kefir como cultura iniciadora: aceitação sensorial e mapa de preferência interno. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 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 bactéria. **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.

PAVLI, F. G., ARGYRI, A. A., CHORIANOPOULOS, N. G., NYCHAS, G.-J., & TASSOU, C. C. Effect of *Lactobacillus plantarum* L125 strains with probiotic potential on physicochemical, microbilogical and sensorial characteristics of dry fermented sausages. **LWT – Food Science and Tecnology**, v. 118, p. 108810, 2020.

PEHRSON, M. E. de S. F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus sp*. que apresentam propriedades probióticas.** Tese de Doutorado. Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.Universidade de São Paulo, 2013.

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

PERINI, F. O. **Avaliação da multiplicação de *Bacillus thurigienses* no leite UHT por meio de modelagem matemática e microbiologia preditiva**. Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

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. **International Journal Food Microbiology**, v. 207, p. 57–65, 2015.

PITHVA, S.; AMBALAM, P.; DAVE, J. M. et al. Potential of probiotic *Lactobacillus strains* as food additives. **INTECH Open Access Publisher**, 2012.

PRADO, B. T. et al. Use of probiotics in the treatment of colorectal cancer: an update bibliographic review. **Journal Health in Focus**, p. 525-551, 2021.

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

PRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool. **Trends Food Science and Technology**, v. 48, p. 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**, v. 47, p. 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 lasalud. **Revista Fuente Año 2**, n. 7, 2011.

RECH, R. A. **Produção de salame tipo italiano com teor de sódio reduzido.** Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

REALE, A.; RENZO, T.; ROSSI, F. 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.

PEDONE, C. A.; ARNAUD, C. C.; POSTAIRE, E. R.; REINERT, P. Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhea, 2000.

RITTER, A. R. C. et al. Evaluation of celery extract (*Apium greveolens L.*) as a natural curing agent in the production of Italian-type Salami with native starter cultures. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 25685-25702, 2020.

ROBAZZA, W. S. Modelagem Matemática do Crescimento de Microrganismos em Alimentos. **Sociedade Brasileira de Matemática Aplicada e Computacional**, v. 1, p. 101-110, 2010.

ROSELINO, M. N.; ALMEIDA, J. F.; COZENTINO, I. C. et al. Probiotic salami with fat and curing salts reduction: physicochemical, textural and sensory characteristics. **Food Science and Technology**, v. 38(2), p. 193-202, 2018.

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* 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**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de São Paulo, p. 125, 2011.

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

SOUZA, B. M. S.; BORGONOVI, T. F.; CASAROTTI, S. N. et al. *Lactobacillus casei* and *Lactobacillu fermentum* strains isoleted from mozzarella cheese: Probiotic potencial, safety, acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. **Probiotics and Anitmicrobial Protein**, v. 11, p. 382 – 396, 2019.

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 artesanal sausage in the production of Italian sausage. **Food Science and Technology**, v.34, n.4, p.780-786, 2014.

SANTOS JUNIOR, L. C. O.; RIZZATI, R.; BRINGERA, A. et al. Composição Centesimal, atividade de água e pH de carne de ovinos de descarte. **V Simpósio de alimentos. Passo Fundos,** 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**, v. 14(37), p. 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**, v. 12, p. 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 de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

SARMENTO, C. M. P.; KALSCHNE, D. L; OLIVEIRA, M. F. B.; GEITENES, S. Modelagem do Crescimento de Bactérias Láticas e Análise Microbiológica em Apresuntado e PresuntoCozido Fatiados e Embalados a Vácuo. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, p. 1, 2013.

SAVOLDI, D. C. et al. Physical and sensory characteristics of Italian-Type Salami with propolis addition. **Revista de Ciências Agroveterinárias,** v. 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. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2020.

SCHLEI, K. P.; REITER, M. G. R.; BERTOLI, S. L. et al. Microbiologia preditiva: aspectos gerais e tendências. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 10, p. 52-68, 2018.

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**, p. 2014. 2014.

SHOKRYAZDAN, P.; JAHROMI, M. F.; LIANG, J. B. 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.; KANELLAKI, M.; KOURKOUTAS, Y. Effect of immobilized *Lactobacillus case*i on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages. **Food Chemistry**, v. 178, p. 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. Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

SILVA, N. Contagem de Bactérias Lácticas. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** Varela 3 Ed**.**, cap. 14, p.183-189, 2007.

SILVA, N. B. Modelagem matemática do crescimento de *Lactobacillus viridescens* sob condições não isotérmicas em presunto fatiado embalado à vácuo. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. 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. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de 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, 2014.

SIQUEIRA JUNIOR. 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. Effect of chestnut flour and probiotic microorganism on the functionality of dried meat sausages. **LWT- Food Science and Technology**, p. 134, 2020.

SLONGO, A. P.; ROSENTHAL, A.; CAMARGO, L. M. et al. Modeling growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, p. 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,** v. 9(2), p. 4919-4928, 2019.

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. **Elsevier Science & Technology**. 2. Ed., p. 612, 2016.

TABANDEH, F.; MOGHADDAM, H. R. H.; YAKHCHALI, B. 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**, v. 26, p. 416-426, 2012.

TACO – **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – 4° 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**, v. 1, p. 250- 258, 2014.

TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; LAPPA, I. K. 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-quimica 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. **Antimicrobials in food**. 3rd Ed. Boca Raton: CBC, p. 169-236, 2005.

TUFARELLI, V.; LAUDADIO, V. An overview on the functional food concept: prospectives and applied researches in probiotics, prebiotics and symbiotics. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, 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. **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**. Dissertação de Mestrado. Programa de PósGraduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2017.

VASCONCELOS, L. I. M. et al. Functional fermented sausages incorporated with microencapsulated *Lactobacillus plantarum* BG 112 in Acrycoat S100. **Food Science and Tecnology**. p. 148. 2021.

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. **System Applied Microbiology**. 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.

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**, v. 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 steks with edible and active coating containing orégano and rosemary essential oils. **Meat Science**. p. 153-158, 2018.

WARD, R. E et al. In vitro fermentation of breast milk ologosacchatides 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.; BINETTI, A.; LACO, M. et al. Prelimanry Technological and potencial probiotic characterization of bifidobacteria isolated form breast Milk for use in dairy produtcs. **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. **Ciência 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 pineaple juic. **LWT – Food Science and Technology**, v.44, p. 239-243, 2011.

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