

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livre e
microencapsulada em salame tipo Italiano**

Juliana Nogueira Ruiz

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2011**

Juliana Nogueira Ruiz

Zootecnista

**Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livre e
microencapsulada em salame tipo Italiano**

Orientadora:

Prof^a. Dra. **CARMEN JOSEFINA CONTRERAS CASTILLO**

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestre em Ciências. Área de
concentração: Ciência e Tecnologia de
Alimentos

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Ruiz, Juliana Nogueira

Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livre e microencapsulada em salame tipo Italiano / Juliana Nogueira Ruiz. - - Piracicaba, 2011.
123 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Análise sensorial 2. Bactérias lácticas 3. Lactobacillus 4. Microencapsulação
5. Probióticos 6. Salame I. Título

CDD 664.92
R934a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

**Aos meus pais, Ariovaldo Ruiz
Pereira e Maria Lidia Nogueira de
Aguilar por todo amor, compreensão,
incentivos e ensinamentos desde o
início da minha existência.**

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas enormes bênçãos, por estar sempre comigo e me mostrar qual o melhor caminho a seguir, sempre...

Aos meus pais, Ariovaldo Ruiz Pereira e Maria Lidia Nogueira de Aguiar, pela dedicação, por me incentivarem a continuar estudando e progredindo. Meu eterno agradecimento. Amo muito vocês!

À minha irmã Daniella Nogueira Ruiz e minha avó Maria Eva Nogueira de Aguiar pelo amor, carinho e por me apoiarem em minhas decisões.

À Diva Miranda, por todo carinho e incentivo.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela excelência em minha formação e por possibilitar a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Carmen Josefina Contreras Castillo, responsável pela minha formação científica, meu eterno agradecimento, pelo apoio, dedicação, confiança e amizade.

À Roberta Teresa Rizzo Benatto, pela amizade, pela ajuda nas análises, e principalmente por todas as risadas e momentos de alegria no decorrer deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Carmen Silvia Fávoro Trindade, pela grande colaboração no projeto, fornecimento das microcápsulas de probióticos, ajuda nas análises microbiológicas e pelas correções da dissertação.

À Prof^a Nilda Villanueva, pela ajuda com as análises estatísticas e discussões.

À Prof^a Marília Oetterer, Dr^a Eunice Akemi Yamada, Prof^a Jocelim Mastrodi Salgado e Dr^a Aline de Oliveira Garcia, pelas correções da dissertação.

A toda equipe do Laboratório de Produtos Funcionais (LAPROF), da FZEA/USP, principalmente a Daniela Lara Pedroso, pela produção das

microcápsulas de probióticos e Melina Akamatsu, bolsista FAPESP do projeto, pelo grande auxílio nas análises microbiológicas.

À Prof^a. Dr^a Angela Dulce Cavenaghi por toda ajuda e ensinamentos práticos, principalmente para os primeiros passos do desenvolvimento do projeto e pelas correções da dissertação.

Às empresas Danisco, Chr. Hansen, Ibrac, Viscofan, Cryovac que gentilmente forneceram insumos necessários para a realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

A toda equipe do Laboratório de Qualidade e Processamento de Carnes que foram primordiais na execução deste trabalho: Alessandra, Márcio, Miriam (Trakinas), Nathaly (Troppo), Priscila (Santiña), Sabrina, Vanessa (Karpada) e Viviane (Massa), em especial à Ana Paula (Impinada), Anna Cristina e Thalita (as "VIPS") agradeço pela imensa ajuda, amizade e companheirismo, pelas conversas e risadas durante as análises e processamentos.

E, por fim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------|----|
| RESUMO..... | 9 |
| ABSTRACT | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1 Probióticos..... | 15 |
| 2.2 Microencapsulação..... | 16 |
| 2.2.1 Microencapsulação por <i>spray chilling</i> | 18 |
| 2.3 Salame | 18 |
| 2.4 Cultura <i>Starter</i> | 20 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 3.1 Material..... | 23 |
| 3.1.1 Matérias-primas cárneas | 23 |
| 3.1.2 Ingredientes não-cárneas..... | 23 |
| 3.1.3 Cultura <i>starter</i> | 23 |
| 3.1.4 Microrganismos Probióticos | 23 |
| 3.1.5 Insumos..... | 23 |
| 3.1.6 Microcápsulas | 24 |
| 3.2 Métodos..... | 24 |
| 3.2.1 Ensaio 1 (Pré-Teste) | 24 |
| 3.2.2 Ensaio 2 | 26 |
| 3.2.3 Processamento dos salames | 27 |
| 3.2.4 Análises..... | 30 |
| 3.2.4.1 Cor Instrumental..... | 30 |
| 3.2.4.2 Avaliação do pH | 31 |
| 3.2.4.3 Determinação da Oxidação Lipídica..... | 31 |
| 3.2.4.4 Determinação da Atividade de Água (Aw)..... | 33 |
| 3.2.4.5 Determinação da Acidez em Ácido Lático..... | 33 |
| 3.2.4.6 Avaliação da Perda de Peso | 34 |
| 3.2.4.7 Contagem dos Probióticos | 35 |
| 3.2.4.8 Avaliação Microbiológica | 36 |
| 3.2.4.9 Análise Sensorial..... | 37 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 41 |
| 4.1 Ensaio 1..... | 41 |
| 4.1.1 Cor Instrumental..... | 41 |
| 4.1.2 Avaliação do pH | 44 |
| 4.1.3 Determinação da Atividade de Água | 45 |
| 4.1.4 Acidez em Ácido Lático | 45 |

| | |
|----------------------------------------------------|-----|
| 4.1.5 Determinação da Perda de Peso | 46 |
| 4.1.6 Análise Sensorial | 48 |
| 4.1.7 Considerações finais sobre o Ensaio 1 | 52 |
| 4.2 Ensaio 2 | 52 |
| 4.2.1 Cor Instrumental | 52 |
| 4.2.2 Avaliação do pH..... | 59 |
| 4.2.3 Determinação da Oxidação Lipídica | 63 |
| 4.2.4 Determinação da Atividade de Água (Aw) | 69 |
| 4.2.5 Determinação da Acidez em Ácido Lático | 73 |
| 4.2.6 Avaliação da Perda de Peso..... | 78 |
| 4.2.7 Contagem dos Probióticos..... | 80 |
| 4.2.8 Bactérias Láticas..... | 83 |
| 4.2.9 Avaliação Microbiológica | 85 |
| 4.3 Análise Sensorial | 88 |
| 4.3.1 Aparência..... | 88 |
| 4.3.2 Textura..... | 90 |
| 4.3.3 Sabor | 93 |
| 4.3.4 Aceitação global..... | 96 |
| 4.3.5 Intenção de compra | 99 |
| 5 CONCLUSÃO | 103 |
| REFERÊNCIAS | 105 |
| ANEXOS..... | 121 |

RESUMO

Aplicação de microrganismos probióticos nas formas livre e microencapsulada em salame tipo Italiano

Os alimentos probióticos são promotores de saúde que apresentam grande interesse comercial e quotas de mercado em crescimento. Devido às suas características, os lactobacilos e bifidobactérias são considerados os melhores microrganismos para uso como probióticos em produtos cárneos, sendo mais promissor nos produtos crus fermentados, haja vista serem consumidos sem prévio aquecimento. Várias técnicas de microencapsulação têm sido empregadas com o propósito de manter a viabilidade dos probióticos durante o tempo de armazenamento. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da incorporação dos microrganismos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* livre e microencapsulado sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame tipo Italiano, assim como a sensibilidade destas culturas frente a diferentes tempos de armazenamento. Para isso, foi realizado um ensaio (ensaio 1) com microrganismos na forma livre incorporados aos salames e comparados com uma amostra padrão, isenta de probióticos. A utilização dos probióticos interferiu positivamente nas avaliações físico-químicas e sensoriais, uma vez que os salames apresentaram um desempenho similar ao controle e uma alta aceitação entre os consumidores. Após a constatação que a incorporação de probióticos era positiva, um segundo ensaio foi realizado (ensaio 2), onde os salames foram divididos em cinco tratamentos: T1 (sem adição de probióticos), T2 (*Lactobacillus acidophilus* livre), T3 (*Lactobacillus acidophilus* encapsulado), T4 (*Bifidobacterium lactis* livre) e T5 (*Bifidobacterium lactis* encapsulado). Nestes ensaios foram verificados o pH, acidez, atividade de água, cor instrumental, oxidação lipídica, contagem dos probióticos, além da realização de análises microbiológicas e sensoriais nos salames com até 90 dias de armazenamento. Durante o processamento, procedeu-se a análise de perda de peso dos salames para garantir a padronização do processo. Os resultados obtidos no ensaio 2 permitem concluir que os menores valores de pH, atividade de água e perda de peso observados foram dos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* ambos na forma livre, além de apresentarem os maiores valores para a determinação de acidez. No entanto, nas contagens dos probióticos, a microencapsulação para as culturas de *Bifidobacterium lactis* foi vantajosa e assegurou que 10^6 UFC/g fossem mantidos no produto final. Por sua vez, nos resultados da análise sensorial concluiu-se que os salames com probióticos foram considerados agradáveis pelos provadores, pois obtiveram pontuações acima de 6,0. A maior média na intenção de compra foi do *Lactobacillus acidophilus* encapsulado com 64,7%, seguido do *Bifidobacterium lactis* livre com 62,5%. Portanto, com estes resultados há evidências de que os salames desenvolvidos neste trabalho independente da cultura probiótica utilizada e da forma apresentada, teriam um grande potencial de venda no mercado consumidor.

Palavras-chave: Probióticos; Salame; *Lactobacillus acidophilus*; *Bifidobacterium lactis*; Microencapsulação; Sensorial

ABSTRACT

Application of probiotic microorganisms of free and microencapsulated in Italian salami

The probiotic foods are health promoters with great commercial interest and growing market shares. Due to its characteristics, the lactobacillus and bifidobacterium are considered the best microorganisms for use as probiotics in meat products, being the most promising raw fermented products, due to be consumed without prior heating. Various microencapsulation techniques have been employed for the purpose of maintaining the viability of probiotics during storage time. The objective of this study was to evaluate the effects of incorporation of microorganisms *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on free and microencapsulated physical-chemical, microbiological and sensory type of Italian salami, as well as the sensitivity of these cultures against different storage times. For this, we performed a test (test 1) in free form by microorganisms embedded in salami and compared with a standard sample, free of probiotics. The use of probiotics had a positive influence on physical-chemical evaluations and sensory, as salami showed a similar performance to the control and a high acceptance among consumers. After finding that the incorporation of probiotics was positive, a second test was performed (test 2), where the salamis were divided into five treatments: T1 (without added probiotics), T2 (*Lactobacillus acidophilus* free), T3 (*Lactobacillus acidophilus* encapsulated), T4 (*Bifidobacterium lactis* free) and T5 (*Bifidobacterium lactis* encapsulated). In these trials were checked the pH, acidity, water activity, instrumental color, lipid oxidation, count of probiotics, in addition to conducting the microbiological and sensory salami with up to 90 days of storage. During processing, we proceeded to the analysis of weight loss of salamis to ensure standardization of the process. The test results allow the conclusion that the two lower values of pH, water activity and weight loss were observed for *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* both on their own, in addition to presenting the highest values for the determination of acidity. However, the counts of probiotic cultures for the microencapsulation of *Bifidobacterium lactis* was advantageous and ensured that 10^6 UFC/g were kept in the final product. In turn, the results of sensory analysis concluded that the salami with probiotics were considered by the judges, as had scores above 6.0. The highest mean purchase intent was encapsulated with *Lactobacillus acidophilus* 64.7%, followed by *Bifidobacterium lactis* free with 62.5%. So, with these results there is evidence that salami developed in this work regardless of the probiotic culture used and as the presented form, have a great potential for sales in the consumer market.

Keywords: Probiotics; Salami, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*; Microencapsulation; Sensory

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos probióticos são promotores da saúde que apresentam grande interesse comercial e quotas de mercado em crescimento (PARVEZ et al., 2006; SENOK; ISMAEEL; BOTA, 2005). Em geral, seus benefícios à saúde são baseados na presença de determinadas culturas viáveis de bactérias lácticas que, quando ingeridas em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Além de seu uso na indústria de laticínios, as culturas probióticas podem ser utilizadas em outros alimentos, incluindo embutidos fermentados (KRÖCKEL, 2006; LEROY; VERLUYTEN; De VUYST, 2006).

Devido às suas características de crescimento e produção de metabólitos, os lactobacilos e bifidobactérias são considerados os melhores microrganismos para uso como probióticos em produtos cárneos, necessitando para isso, resistir ao processo de fermentação. O uso de probióticos mostra-se mais promissor nos produtos crus fermentados, haja vista serem consumidos sem prévio aquecimento, o que causaria a morte dos probióticos, como argumentado por Erkkilä et al. (2001).

Salame é um embutido classificado como produto fermentado cru, seco ou semi-seco e não-emulsionado. É preparado com a mistura de carnes moídas, com variações quanto à composição e adição de condimentos e aditivos. Diferencia-se dos demais embutidos pelo baixo teor de umidade e pela presença de ácido láctico, que confere sabor característico. Os produtos fermentados secos mantêm as características adquiridas durante as fases do processamento e maturação, pela ação de vários fatores que agem em sinergismo (BRASIL, 2000).

Várias técnicas têm sido empregadas com o propósito de prover formas convenientes destas bactérias para estocagem e aplicação no desenvolvimento de produtos alimentícios, mantendo a sobrevivência dos probióticos durante a vida útil do produto. O processo de microencapsulação, que consiste no revestimento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, tem sido uma alternativa viável para resolver os problemas de instabilidade dos probióticos, além de melhorar o desempenho do ingrediente e possibilitar novas aplicações (ARSHADY, 1993).

Com o intuito de oferecer ao consumidor novas opções de produtos que contenham microrganismos probióticos e viabilizar o uso dessas culturas no

ambiente cárneo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da aplicação dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* livre e microencapsulado sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do salame, assim como a sensibilidade destas culturas frente a diferentes tempos de armazenamento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Probióticos

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2001). Segundo Leroy, Verluyten e De Vuyst (2006), Ammor e Mayo (2007), os probióticos necessitam ser ingeridos em quantidades suficientes para exercerem efeito benéfico sobre a fisiologia e saúde do hospedeiro.

No Brasil, a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (BRASIL, 1999) têm avaliado os produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde para serem aprovados no país. Anteriormente, a referida Comissão recomendava que um alimento funcional probiótico devesse apresentar uma concentração mínima de microrganismos da ordem de 10^6 UFC g^{-1} dentro do prazo de validade do produto (BRASIL, 2001). Atualmente, a recomendação é estabelecida com base na porção diária de alimento, que o mínimo estipulado seja de 10^8 a 10^9 UFC/g/dia (BRASIL, 2007). Entretanto, é importante, ressaltar que ao informar as concentrações bacterianas efetivas seja indicado, claramente, que a concentração probiótica necessária varia em função da cepa e do efeito desejado sobre a saúde (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005).

A maioria dos produtos probióticos comerciais contém uma ou múltiplas cepas de bactérias lácticas (BAL) que pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (MERCENIER; PAVAN; POT et al., 2003). De modo geral, os lactobacilos podem colaborar na digestão da lactose em indivíduos com intolerância a esse dissacarídeo e ajudar na resistência a infecções por salmonela. Bifidobactérias são conhecidas por estimularem o sistema imunológico, produzirem vitamina B, inibirem a multiplicação de patógenos e reduzirem a concentração de amônia e colesterol no sangue (MANNING, GIBSON, 2004; PICARD et al., 2005; LEAHY et al., 2005; NOVIK et al., 2006).

Consideram-se como probióticos, as cepas de microrganismos que possuem a capacidade de resistir a condições ácidas, à ação da bile e lisozima, além de

colonizar o trato intestinal humano, ao menos temporariamente, mediante a adesão às células intestinais. Além dessas características, somam-se outras condições complementares necessárias às culturas probióticas como a capacidade de ativação, rápido crescimento e permanência no intestino por um período aceitável, resistência aos antibióticos que poderiam estar presentes em algum alimento, porém apresentando sensibilidade àqueles usados em tratamentos contra bactérias lácticas (penicilinas e aminoglicosídeos) e ausência de propriedades patogênicas, tóxicas, alérgicas, mutagênicas ou carcinogênicas (HUGAS; MONFORT, 1997).

No geral, os probióticos não colonizam o trato gastrointestinal humano permanentemente, mas algumas cepas podem colonizar e modular transitoriamente a microbiota endógena. As bactérias probióticas podem também neutralizar processos inflamatórios estabilizando uma microbiota saudável e assim melhorando a barreira da permeabilidade do intestino (GUEIMONDE; SALMINEN, 2006).

2.2 Microencapsulação

Microencapsulação é a tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas micropartículas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas (TODD, 1970). Trata-se de uma tecnologia inovadora que tem sido empregada com êxito na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia.

De acordo com Arshady (1993), enquanto as embalagens convencionais são empregadas para facilitar transporte, armazenagem, manipulação e apresentação dos alimentos, as microcápsulas são geralmente empregadas para melhorar o desempenho do ingrediente ou criar novas aplicações.

Nos últimos anos, a indústria de alimentos demonstra necessidades cada vez mais complexas em suas formulações, que muitas vezes só podem ser conferidas através da microencapsulação. (GOUIN, 2004). Entre os materiais que têm sido encapsulados, para aplicação na indústria alimentícia, incluem-se ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, aromas, edulcorantes, corantes, enzimas, microrganismos probióticos e peptídeos bioativos (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002).

A microencapsulação de probióticos tem sido amplamente empregada nos últimos anos, com objetivo de promover proteção (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007; SHIMA et al., 2009), manutenção da viabilidade da bactéria durante a vida útil do produto e liberação controlada no sítio de ação do microrganismo prevenindo alterações sensoriais (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

Várias técnicas têm sido empregadas na elaboração de microcápsulas, a extrusão é a mais popularmente empregada, devido ao baixo custo e simplicidade, além de não envolver altas temperaturas. Podemos citar ainda a atomização, emulsão, coacervação e imobilização em gorduras e grânulos de amido (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). Muitos materiais podem ser utilizados como cobertura para as microcápsulas, dentre eles, a goma arábica, agar, alginato e carragena; carboidratos, amidos modificados, lipídeos, óleos e gorduras, materiais inorgânicos, proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (JACKSON; LEE, 1991).

Devido à natureza delicada de muitas bactérias probióticas, a sobrevivência em concentrações suficientes durante a estocagem e a passagem pelo trato gastrointestinal são os maiores desafios para a viabilidade dessas bactérias (ANNAN; BORZA; HANSEN, 2008). Frente a isto, vários estudos têm sido realizados, com objetivo de verificar o efeito benéfico da microencapsulação sobre a viabilidade da cultura probiótica, durante a estocagem do produto e passagem pelo trato gastrointestinal.

Lahtinen et al. (2007) imobilizaram bifidobactérias em uma matriz lipídica, a base de manteiga de cacau, em modelos simulando bebidas fermentadas e não fermentadas, o que resultou em um aumento da viabilidade da bactéria, durante a estocagem. Este resultado sugere que a matriz lipídica pode proteger os microrganismos frente à exposição à água e íons H^+ . Além disso, a incorporação de probióticos em micropartículas lipídicas parece ser interessante, uma vez que os lipídios têm a vantagem de ser facilmente digerido no intestino pelas lipases, possibilitando a liberação do microrganismo probiótico em seu sítio de ação (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

2.2.1 Microencapsulação por *spray chilling*

A microencapsulação por *spray chilling*, também conhecido por *spray cooling* e *spray congealing* é uma técnica similar ao *spray dryer*. No entanto, fundamenta-se na injeção de ar frio para permitir a solidificação da partícula. As micropartículas são produzidas por uma mistura contendo o ingrediente ativo (ou recheio) e o agente encapsulante, na forma de gotículas. Essa mistura é pulverizada por um atomizador ou bico aspersor e entra em uma câmara, na qual o ar circula a baixa temperatura (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). A redução da temperatura resulta na solidificação do material e permite que o microrganismo seja encapsulado.

São usados no *spray chilling*, lipídios com pontos de fusão que podem variar de 45°C a 122°C, incluindo triglicerídios, diglicerídios, monoglicerídios, ácidos graxos livres, esteróides ou ceras (TAYLOR, 1983; DZIEZAK, 1988; JACKSON; LEE, 1991). Esse processo é o menos custoso e é usado também na conversão de ingredientes líquidos hidrofílicos em pós secos (GOUIN, 2004). As partículas assim produzidas são aplicadas em produtos com alto teor de lipídios (TAYLOR, 1983).

A microencapsulação por *spray chilling* representa um método alternativo, que pode proporcionar a utilização de diferentes tipos de agentes encapsulantes. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos deste método sobre a viabilidade das células e a proteção proporcionada contra os agentes externos.

2.3 Salame

Entende-se por salame, o produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina, adicionado de toucinho e ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curado, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado (BRASIL, 2000). O produto final se conserva a temperatura ambiente em consequência da inibição das bactérias patogênicas e deteriorantes (FERNÁNDEZ et al., 2001; HUGAS; MONFORT, 1997).

A introdução dos produtos cárneos fermentados no Brasil, data da colonização por imigrantes alemães e italianos, principalmente na região sul do país. Este fenômeno social deu origem à industrialização deste produto, sendo que atualmente é um importante segmento da indústria cárnea (LAPPE, 2004). O salame tipo

Italiano é um produto de alto valor agregado cujo consumo tende a aumentar e cujos consumidores são exigentes em termos de qualidade (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000). No Brasil, o termo salame é genérico e geralmente aplicado aos embutidos fermentados, que se diferenciam pela espécie animal da carne utilizada, forma de preparação da gordura, quantidade de sal e tipo de condimentação utilizada, natureza e dimensão do envoltório empregado, presença ou não de bolor superficial e pelas condições de tempo e temperatura aplicadas durante a fermentação (BERAQUET, 2005). Dois fatores básicos tornam este produto diferente dos demais embutidos: baixo teor de umidade e presença de ácido láctico, que confere o sabor característico (BACUS, 1984).

A fermentação é a fase mais demorada e complexa do processo de elaboração dos salames, quando ocorre a maioria das alterações físicas, bioquímicas e microbiológicas (BERIAIN; PENA; BELLO, 1993). É influenciada pelas características da matéria-prima (BACUS, 1984) do processo e responsável pelas propriedades sensoriais presentes no produto final (*flavour*, cor e textura), como também pela conservação e segurança do embutido fermentado. Lizasco, Chasco e Beriain (1999) resumiram as transformações nas seguintes etapas: alteração na microbiota inicial, decréscimo nos valores de pH, redução de nitrato a nitrito com formação da nitrosomioglobina, solubilização e gelificação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, proteólise, lipólise e fenômenos oxidativos, além da desidratação.

A variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo Italiano durante o seu processamento, são interdependentes. Com isso, qualquer alteração sugerida para melhoria da qualidade influenciará nas características do produto final, dentre elas, atividade de água, cor e textura (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

A aplicação do mofo *Penicillium nalgiovense* e da levedura *Debaromyces hansenii* na superfície do salame colabora na formação do *flavour*, pela formação de compostos voláteis, por ação de enzimas tais como, desaminases, transaminases e desidrogenases (FERNÁNDEZ et al., 2001).

2.4 Cultura *Starter*

Cultura *starter* pode ser definida como uma preparação contendo um número significativo de microrganismos a ser adicionada à matéria-prima com o objetivo de acelerar o processo de fermentação. Adaptados ao substrato, os *starter* dominam o processo fermentativo e permitem a obtenção de produtos com características esperadas e estáveis (HOLZAPFEL, 2002; LEROY; De VUYST, 2004). Deve apresentar crescimento vigoroso em concentrações de 6% de cloreto de sódio e de 100 mg/Kg de nitrito, crescimento na faixa de temperatura de 20 a 43°C e não apresentar atividade patogênica ou produzir substâncias tóxicas (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

A adição intencional de cultura *starter* tem o propósito de melhorar a estabilidade do produto, aumentar a vida útil, por meio da inativação de microrganismos patogênicos e diversificar os produtos pela introdução de novas características sensoriais (LÜCKE, 2000). Dentre os microrganismos atualmente utilizados como cultura *starter* destaca-se a utilização conjunta de *Staphylococcus xylosus* e *Pediococcus pentosaceus*. O *S. xylosus* apresenta atividade anaeróbia facultativa e temperatura ótima de crescimento de 30°C, é responsável pela formação de catalase, redução de nitrato a nitrito, assim como pelos processos de lipólise e proteólise. O *P. pentosaceus* também é anaeróbio facultativo, apresenta desenvolvimento ótimo a 35°C e é responsável pela produção de ácido lático (CHR. HANSEN, 2008), o que contribui para aumentar a segurança dos embutidos cárneos via redução do pH.

O ácido lático coagula as proteínas solúveis da carne, reduz sua capacidade de retenção de água e contribui com o processo de secagem (LÜCKE, 2000), além de colaborar com o sabor e aroma característicos do produto (BACUS, 1986). Por sua vez, a atividade nitrato redutase das cepas de *Staphylococcus* tem papel significativo na formação de óxido nítrico para a formação de nitrosomioglobina (GØTTERUP et al., 2008) e esses microrganismos também são responsáveis pela formação de importantes compostos voláteis nos embutidos (OLESEN; MEYER; STAHNKE, 2004).

O *S. xylosus*, juntamente com *S. carnosus*, *S. saprophyticus* e *Kocuria varians* são as espécies de estafilococos coagulase negativa mais frequentemente utilizados

como cultura *starter* comercial no processamento de embutido cárneo fermentado, sendo o primeiro, uma espécie proteolítica, com alta atividade nitrato redutase (BONOMO et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Matérias-primas cárneas

As matérias-primas cárneas (paleta suína, acém bovino e toucinho) foram adquiridas no comércio local da cidade de Piracicaba – SP.

3.1.2 Ingredientes não-cárneos

Os ingredientes não-cárneos (nitrito e nitrato de sódio, dextrose, maltodextrina, tripolifosfato de sódio, eritorbato monossódico, glutamato monossódico, pimenta branca moída, noz moscada, coentro e alho em pó), foram fornecidos pela empresa Ibrac® (Rio Claro, SP).

3.1.3 Cultura *starter*

A cultura *starter* comercial Bactoferm T-SPX contendo os microrganismos *Staphylococcus xylosus* DD-34 e *Pediococcus pentosaceus* PC-01 foi fornecida pela Chr. Hansen S/A (Copenhagen, Dinamarca).

3.1.4 Microrganismos Probióticos

Devido às características já estudadas há algum tempo pelos grupos de pesquisa, foram escolhidos para este trabalho os microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* (Howaru® Dophilus LYO 40 DCU) e *Bifidobacterium lactis* (Bi-07 300B 100 GM STD), fornecidos pela Danisco S/A (Copenhagen, Dinamarca).

3.1.5 Insumos

Outros insumos como as tripas de colágeno para embutimento dos salames e a embalagem plástica para acondicionamento dos produtos foram doados pelas

empresas Viscofan® (São Paulo, SP) e Cryovac® (São Paulo, SP), respectivamente.

3.1.6 Microcápsulas

As microcápsulas de probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* foram provenientes do Laboratório de Produtos Funcionais, do Departamento de Engenharia de Alimentos – FZEA / USP.

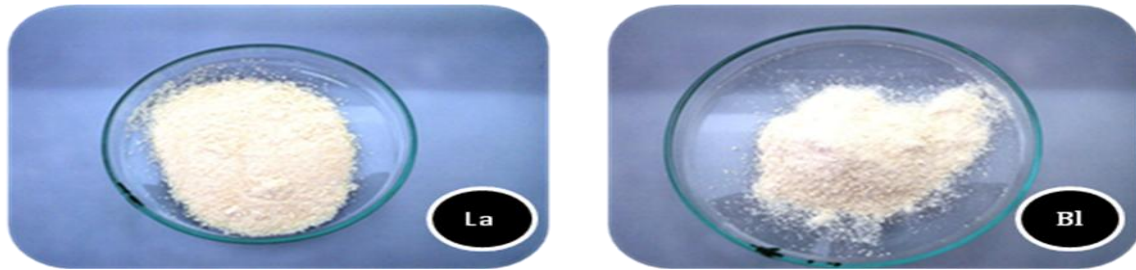
Para encapsulação dos probióticos foi utilizada a gordura interesterificada de palma e palmiste (marca Vigor, Brasil) através da técnica *spray chilling* (atomizador da Laqmaq do Brasil), de acordo com o método descrito por Chambi et al. (2008), com algumas modificações.

Foram avaliadas as proporções de inóculo:gordura, de 1:10 e 1:4, com o objetivo de atingir no mínimo a contagem de 10^7 UFC/g de microcápsulas. Para melhor homogeneização entre inóculo e gordura, estas foram previamente derretidas, resfriadas a 50°C, acrescidas do inóculo e lecitina (1%) e então submetidas à formação de uma emulsão, em Ultra-Turrax (Ika-T10), por 1 minuto a 9.500 rpm. A emulsão foi atomizada em uma câmara fria, a 10°C, utilizando um atomizador duplo fluido de 0,7 mm e pressão do ar de 1 kgf/cm². A redução da temperatura resulta na solidificação do material e fez com que o inóculo, no caso os probióticos, fossem encapsulados.

3.2 Métodos

3.2.1 Ensaio 1 (Pré-Teste)

Para a elaboração dos salames do pré-teste, preparou-se 9 kg de produto que foram divididos em três tratamentos, sendo o controle (sem adição de probióticos), La (formulação com *Lactobacillus acidophilus*) e BI (formulação com *Bifidobacterium lactis*) (Figura 1). A porcentagem dos ingredientes foi calculada com base na matéria-prima cárnea utilizada, considerada como 100% (Tabela 1).



La: *Lactobacillus acidophilus* e Bl: *Bifidobacterium lactis*.

Figura 1 – Formas de probióticos utilizados nos tratamentos dos salames do ensaio 1

Tabela 1 – Formulação do pré-teste

| Matérias-primas e Ingredientes | C | La | Bl |
|------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| <i>Matéria-prima cárnea</i> | | | |
| Paleta suína (%) | 60 | 60 | 60 |
| Acém bovino (%) | 20 | 20 | 20 |
| Toucinho (%) | 20 | 20 | 20 |
| <i>Ingredientes não-cárneos</i> | | | |
| Nitrato de sódio (%) | 0,015 | 0,015 | 0,015 |
| Nitrito de sódio (%) | 0,015 | 0,015 | 0,015 |
| Sal refinado (%) | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Açúcar (%) | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Dextrose (%) | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| Maltodextrina (%) | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Tripolifosfato de sódio (%) | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Eritorbato monossódico (%) | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Glutamato monossódico (%) | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Pimenta branca moída (%) | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Coentro (%) | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Alho em pó (%) | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Noz moscada (%) | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Cultura <i>starter</i> (BACTOFERM T-SPX) * (%) | 0,0125 | 0,0125 | 0,0125 |
| Água mineral (%) | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| Culturas probióticas** (%) | - | 1 | 1 |

*Composta por *Staphylococcus xylosus* DD-34 e *Pediococcus pentosaceus* PC-1 (Contagem total de células: $>1,8 \times 10^{10}$ UFC/g).

** Composta por *Lactobacillus acidophilus* (Howaru® Dophilus LYO 40 DCU) e *Bifidobacterium lactis* (Bi-07 300B 100 GM STD), de acordo com o tratamento.

O objetivo do pré-teste foi avaliar os efeitos da incorporação dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* sobre as características físico-químicas e sensoriais do salame.

3.2.2 Ensaio 2

Este ensaio compreende quatro processamentos e suas respectivas análises. Para cada processamento preparou-se 40 kg de produto que foram divididos em cinco tratamentos: T1 (sem adição de probióticos), T2 (*Lactobacillus acidophilus* livre), T3 (*Lactobacillus acidophilus* encapsulado), T4 (*Bifidobacterium lactis* livre) e T5 (*Bifidobacterium lactis* encapsulado) (Figura 2). Os ingredientes não-cárneos foram calculados com base na matéria-prima cárnea utilizada, a qual foi considerada como 100%, conforme formulação da Tabela 2.



T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre e T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

Figura 2 – Formas de probióticos utilizados na elaboração dos salames do ensaio 2

Tabela 2 – Formulação do salame tipo Italiano do ensaio 2

| Matérias-primas e Ingredientes | Tratamentos | | | | |
|------------------------------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| <i>Matéria-prima cárnea</i> | | | | | |
| Paleta suína (%) | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| Acém bovino (%) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Toucinho (%) | 20 | 20 | 19 | 20 | 19 |
| <i>Ingredientes não-cárneos</i> | | | | | |
| Nitrato de sódio (%) | 0,015 | 0,015 | 0,015 | 0,015 | 0,015 |
| Nitrito de sódio (%) | 0,015 | 0,015 | 0,015 | 0,015 | 0,015 |
| Sal refinado (%) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Açúcar (%) | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| Dextrose (%) | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| Maltodextrina (%) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Eritorbato monossódico (%) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Tripolifosfato de sódio (%) | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Glutamato monossódico (%) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Pimenta branca moída (%) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Coentro (%) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Alho em pó (%) | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Noz moscada (%) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Cultura <i>starter</i> (BACTOFERM T-SPX) * (%) | 0,0125 | 0,0125 | 0,0125 | 0,0125 | 0,0125 |
| Água mineral (%) | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 | 0,75 |
| Culturas probióticas** (%) | ausente | 1 | 1 | 1 | 1 |

*Composta por *Staphylococcus xylosus* DD-34 e *Pediococcus pentosaceus* PC-1 (Contagem total de células: $>1,8 \times 10^{10}$ UFC/g)

** Composta por *Lactobacillus acidophilus* (Howaru® Dophilus LYO 40 DCU) e *Bifidobacterium lactis* (Bi-07 300B 100 GM STD), de acordo com o tratamento.

3.2.3 Processamento dos salames

As carnes bovinas e suínas, a uma temperatura de -4 a 0°C, foram moídas utilizando-se discos n°5 (5 mm) e n°10 (10 mm) respectivamente, em moedor da marca Hobart (modelo HB22-2). O toucinho, ainda congelado, a uma temperatura de -18°C, foi moído em disco n°8 (8 mm) (Figura 3).

A cultura *starter* foi hidratada 30 minutos antes de sua incorporação à massa, adicionando-se água à temperatura ambiente e a dextrose.

Na misturadeira da marca Beccaro (modelo MB-25), adicionaram-se primeiramente a carne suína e bovina, seguida do toucinho. Após homogeneização das matérias-primas cárneas, adicionaram-se os ingredientes não-cárneos, sendo que a cultura *starter* pré-hidratada, os probióticos e o antioxidante foram, respectivamente, os últimos a serem adicionados.

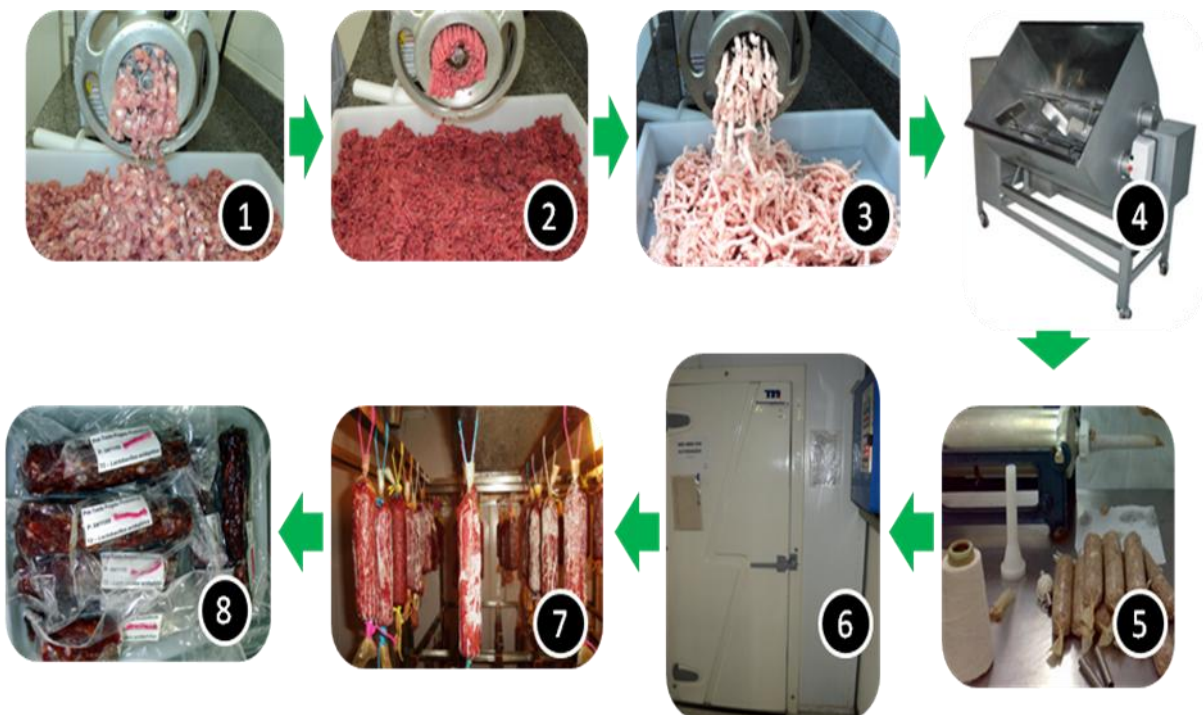


Figura 3 – Etapas do processamento do salame tipo Italiano, sendo 1= moagem da carne suína; 2= moagem da carne bovina; 3= moagem do toucinho; 4= misturadeira; 5= embutimento; 6= câmara de fermentação; 7= secagem e 8= produto final embalado a vácuo

Os tratamentos com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* encapsulados (T3 e T5) receberam 80 g de probióticos microencapsulados e a quantidade de toucinho na formulação foi reduzida a 19% (1,52 kg).

Após homogeneização completa, coletou-se uma amostra de cada tratamento para realização das análises, sendo que a amostra para análise microbiológica foi coletada após o embutimento.

O embutimento foi realizado em uma embutideira manual em tripas de colágeno reconstituído (4,5 cm de diâmetro e 25 cm de comprimento) hidratadas em solução salina de NaCl a 15% por 15 minutos antes de sua utilização. A identificação

dos diferentes tratamentos foi feita utilizando-se de linhas coloridas para fechar as extremidades do salame após o embutimento. Posteriormente ao embutimento, as peças de salame foram dispostas aleatoriamente em carrinho de aço inoxidável e levadas à câmara com temperatura e umidade controladas. Antes de iniciar o processo de fermentação foi feita a aspersão de uma mistura da cultura *starter*, dextrose e água na superfície dos salames visando prevenir a multiplicação de microrganismos indesejáveis.

Para a fermentação, empregou-se temperatura de 23 a 25°C e umidade relativa de 88 a 90%. Após o processo fermentativo, determinado quando as peças de salame atingissem valores de pH entre 5 e 5,2, a temperatura foi reduzida à faixa de 15 a 17°C e a umidade foi reduzida a 1 a 2% ao dia, até atingir 75% e permanecendo até o final do processo de secagem (Figura 4).

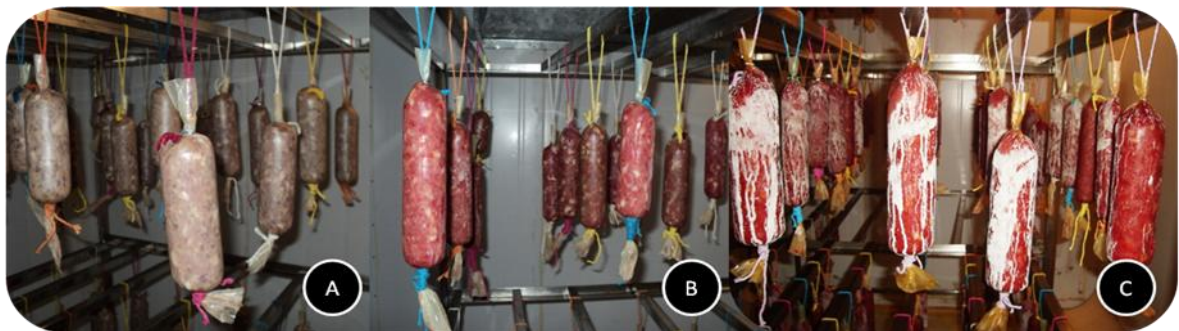


Figura 4 – Peças de salame antes da fermentação (A), pós fermentação (B) e ao final do processo de secagem (C)

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

O controle dos parâmetros de umidade relativa e temperatura foram conduzidos através de painel eletrônico do próprio equipamento sendo que os valores indicados neste painel foram acompanhados constantemente pelas medidas obtidas por um termômetro de bulbo seco e bulbo úmido presente no interior da câmara.

Com a finalização do processo de secagem, determinado após 13 dias apresentando atividade de água inferior a 0,90, retirou-se manualmente as tripas e

os salames foram acondicionados, individualmente, em embalagem plástica a vácuo e mantidos sob refrigeração em câmara B.O.D., a temperatura de 18°C, para realização das análises de vida útil.

A embalagem plástica utilizada para o acondicionamento dos salames constitui-se de uma estrutura multicamadas de etileno-acetato de vinila (EVA), com permeabilidade máxima ao oxigênio de 30 cm³/m² dia e permeabilidade máxima ao vapor de água de 10 g/m² dia (CRYOVAC, 2007).

3.2.4 Análises

3.2.4.1 Cor Instrumental

Com a finalidade de verificar as alterações de cor no salame em função da aplicação dos tratamentos escolhidos, realizaram-se medidas físicas dos parâmetros L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho/verde) e b* (intensidade de amarelo/azul) do sistema CIELab, com fonte iluminante D65 e calibrado com porcelana padrão (Y = 93,7, x = 0,316 e y = 0,3323) (INTERNATIONAL COMMISSION ON ILLUMINATION, 1978). Para esta medida física da cor, utilizou-se o colorímetro portátil Minolta Chroma Meter (modelo CR-400).



Figura 5 – Procedimento de análise de medida física da cor (L*, a* e b*) nas amostras de salame

As medições foram realizadas no tempo 0 (salame maturado) e nos salames armazenados por 30, 60, 90, 120 e 150 dias, sendo 3 peças de cada tratamento escolhidas aleatoriamente, com 3 medições por peça, totalizando 9 medições por tratamento, exceto a massa, cuja cor foi mensurada em 9 pontos distintos logo após

homogeneização em misturadeira. As medições foram realizadas diretamente sobre as amostras, tomando-se o cuidado de não mensurar sobre uma partícula de gordura aparente.

3.2.4.2 Avaliação do pH

As medições de pH foram realizadas utilizando-se um eletrodo de penetração de corpo de vidro. O aparelho utilizado foi um potenciômetro da marca Denver Instrument (modelo UB-10), calibrado com solução tampão de pH 4 e 7.



Figura 6 – Medições de pH nas amostras de salame

As medições de pH foram realizadas no tempo 0 (salame maturado) e nos salames armazenados por 30, 60, 90, 120 e 150 dias, sendo 3 peças de cada tratamento escolhidas aleatoriamente, com 3 medições por peça, totalizando 9 medições por tratamento, exceto a massa, cujo pH foi mensurado em 9 pontos distintos logo após homogeneização em misturadeira.

3.2.4.3 Determinação da Oxidação Lipídica

Com a finalidade de mensurar a oxidação lipídica nos diferentes tratamentos de salame do ensaio 2, empregou-se o método de quantificação das substâncias

reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), segundo metodologia proposta por Bruna et al. (2001) e Hoz et al. (2004), com algumas adaptações.

Os aldeídos foram extraídos preparando-se um extrato ácido-aquoso, homogeneizado por 3 minutos em Ultra-Turrax (Ika), composto por 5 g de amostra triturada, 15 mL de ácido perclórico (HClO_4) a 0,38 M e 0,5 mL de solução etanólica do antioxidante butil hidroxi tolueno - BHT ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$) a 0,19 M para evitar a oxidação durante a análise. O homogenato foi centrifugado a 3000 g (\approx 4850 rpm) por 5 minutos a 5°C em centrífuga refrigerada marca Eppendorf (modelo 5810-R) e filtrado em *Whatman* n° 54. Uma alíquota de 5 mL do extrato filtrado foi adicionada de 5 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico – TBA ($\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) a 0,02 M e aquecido em banho-maria por 30 minutos a 100°C. Após resfriamento, a mistura foi centrifugada novamente a 3000 g (\approx 4850 rpm) por 15 minutos. Durante o aquecimento ocorreu à formação do complexo colorido, cuja absorbância foi mensurada em espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV-Vis mini 1240), no comprimento de onda de 532 nm.

Para quantificar o complexo colorido formado, fez-se necessária a elaboração de uma curva padrão, onde se utilizou o composto padrão 1,1,3,3 tetraetoxipropano - TEP ($[\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2]_2\text{CHCH}_2\text{CH}[\text{OC}_2\text{H}_5]_2$) cuja hidrólise ácida gera o malonaldeído na proporção de 1:1 mol. A concentração de TEP (em $\mu\text{mol/L}$) de cada ponto da curva foi calculada de acordo com a massa inicial de TEP da solução inicial. Os resultados obtidos com diferentes concentrações de TEP foram plotados em gráfico de dispersão, com regressão linear, obtendo-se a equação de uma reta (com $R^2 > 0.99$). A equação obtida foi utilizada na obtenção dos valores das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) sendo que os resultados obtidos foram expressos em mg de malonaldeído por kg de amostra (mg MDA/kg).

Para a obtenção desses resultados, também se fez necessário a quantificação do teor de umidade das amostras (% água), o qual foi determinado por método gravimétrico com dessecação de 10g de amostra em estufa a 105°C (PREGNOLATTO; PREGNOLATTO, 1985).

Esta análise de quantificação da oxidação lipídica das amostras de salame foi realizada em triplicata no tempo 0 (salame maturado) e nos salames armazenados por 30, 60, 90, 120 e 150 dias. A amostragem para cada tratamento foi composta de 3 salames escolhidos aleatoriamente, triturados e homogeneizados, exceto na

massa, no qual uma amostra de aproximadamente 150 g foi coletada após homogeneização completa na misturadeira.

3.2.4.4 Determinação da Atividade de Água

A atividade de água foi determinada por medida direta utilizando-se o analisador Aqualab marca Decagon Devices Inc. (modelo 4TE) operando-se a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 0,3$. Fatias de aproximadamente 3 mm de espessura, sem as bordas foram dispostas em cápsulas próprias para a análise, com exceção da massa que foi distribuída no fundo da cápsula com o auxílio de uma espátula.



Figura 7 – Cápsula com amostra de salame utilizada para a determinação direta da atividade de água

As determinações de atividade de água foram realizadas no tempo 0 (salame maturado) e nos salames armazenados por 30, 60, 90, 120 e 150 dias, com uma medição para cada salame, sendo 3 salames de cada tratamento escolhidos aleatoriamente, totalizando assim 3 medições por tratamento, exceto a massa, cuja atividade de água foi mensurada logo após homogeneização em misturadeira.

3.2.4.5 Determinação da Acidez em Ácido Láctico

A acidez láctica foi determinada pela metodologia BRASIL (1999), a qual se fundamenta na neutralização dos íons de hidrogênio livre, até o ponto de equivalência, pelo hidróxido de sódio na presença do indicador fenolftaleína.

Em um béquer de 150 mL, 10 g de amostra foi pesada e transferida para processador com auxílio de 200 mL de água destilada. Esta solução foi triturada por 1 minuto em Ultra-Turrax (Ika) e transferido todo o seu conteúdo para o balão volumétrico de 250 mL, completando o seu volume com água destilada. A solução foi filtrada e em seguida transferiu-se 25 mL do filtrado para erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 75 mL de água destilada e três gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Para a prova em branco, foi feita uma solução com 100 mL de água destilada e três gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1%.

As amostras foram tituladas previamente com solução de hidróxido de sódio 0,1 N usando solução alcoólica de fenolftaleína a 1% como indicador. O ponto de viragem foi o aparecimento de leve coloração rósea persistente por 30 segundos.

Esta análise de determinação da acidez titulável foi realizada em triplicata no tempo 0 (salame maturado) e nos salames armazenados por 30, 60, 90, 120 e 150 dias. A amostragem para cada tratamento foi composta de três salames escolhidos aleatoriamente, triturados e homogeneizados.

$$\text{Acidez em ácido láctico} = \frac{(V - V') \times f \times 0,09 \times N \times 100}{p}$$

p

Onde:

V = mililitros de solução de hidróxido de sódio gastos na titulação;

V' = mililitros de solução de hidróxido de sódio gastos na titulação de branco;

p = massa da amostra na alíquota;

f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

0,09 = fator de conversão do ácido láctico.

3.2.4.6 Avaliação da Perda de Peso

Com a finalidade de acompanhar a perda de peso das peças de salame durante o processo de fermentação e secagem (13 dias), três peças de cada tratamento obtidas aleatoriamente a partir de três locais diferentes do interior da câmara de secagem (frontal, lateral direita e lateral esquerda) foram identificadas individualmente com o auxílio de anilhas numeradas e pesadas diariamente até o final do processamento em balança semi-analítica (marca Marte – modelo AL500C).

3.2.4.7 Contagem dos Probióticos

A contagem das populações probióticas foram conduzidas no Laboratório de Produtos Funcionais do Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) em três peças de salame escolhidos aleatoriamente do ensaio 2, nos tempos massa, tempo 0 (salame maturado) e nos salames armazenados por 30, 60 e 90 dias, uma vez que a análise sensorial também foi realizada nestes períodos. As amostras foram preparadas em capela com fluxo laminar previamente exposto à luz UV por 30 minutos, pesando-se 25 g de salame de cada tratamento e adicionando-se 225 mL de solução de água peptonada em embalagem plástica de polietileno estéril. Em seguida a amostra foi homogeneizada em homogeneizador de amostras da marca Marconi (modelo MA 440/CF) por 2 minutos, constituindo assim a diluição 10^{-1} . A partir desta diluição, obtiveram-se as diluições 10^{-2} a 10^{-8} em tubos de ensaio estéreis. Uma alíquota de 1 mL de cada tubo foi retirada e adicionada a uma placa de Petri descartável, estéril e devidamente identificada com os tratamentos.

Para os tratamentos 2 e 3 que continham os microrganismos *Lactobacillus acidophilus*, após o plaqueamento (em duplicata) foram adicionados cerca de 13 mL de Agar MRS (preparado de acordo com as instruções do fabricante) à placa e homogeneizados. Para a análise microbiológica de *Bifidobacterium lactis* dos tratamentos 4 e 5, o Agar utilizado foi modificado, de acordo com Grosso e Fávoro-Trindade (2004), pela adição de 0,5% de solução de L-cisteína, 1% de solução de cloreto de lítio, 0,01% de azul de anilina e 0,5% de solução de dicloxacilina, sendo que esta última foi adicionada após a esterilização em unidade filtrante Millipore, com filtro de 22 µm.

A seguir, com o Agar já solidificado, as placas foram invertidas e colocadas em jarras de anaerobiose (15 placas por jarra). Para promover a ausência de oxigênio, fundamental para a multiplicação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, foi colocado junto com as placas dentro da jarra o envelope de anaerobiose (PROBAC), adicionando-se cerca de 20 mL de água destilada ao envelope. As jarras com placas de *Lactobacillus acidophilus* foram identificadas e incubadas a 43°C por 72 horas em câmara B.O.D. (THARMARAJ; SHAH, 2003). As placas de *Bifidobacterium lactis* foram identificadas e incubadas a 37 °C por 72 horas em câmara B.O.D. (GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004). Ao final da incubação de

ambas, foi realizada a leitura das placas, segundo a metodologia descrita por Grosso e Fávaro-Trindade (2004).

3.2.4.8 Avaliação Microbiológica

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, através da Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001, aprovou o regulamento técnico de padrões microbiológicos para alimentos, incluindo um item específico para produtos cárneos maturados como os salames. A

Tabela 3 define o padrão microbiológico por amostra indicativa de salame para cada microrganismo previsto.

Tabela 3 – Tolerância permitida para os microrganismos que devem ser pesquisados em salame tipo Italiano

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

Fonte: BRASIL, 2001.

As análises microbiológicas e quantificação de microrganismos patogênicos foram conduzidas no Laboratório de Produtos Funcionais do Departamento de Engenharia de Alimentos (ZEA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) em amostras de salame dos processamentos 1 e 4, com o intuito de avaliar a qualidade microbiológica e segurança do produto final.

Para a análise presuntiva de *Salmonella* spp. utilizou-se o kit VIP® da Biocontrol, seguindo-se a metodologia para alimentos processados, conforme indicado pelo fabricante. Para isto, realizou-se o pré-enriquecimento onde a amostra na diluição 10⁻¹ foi incubada a temperatura entre 35 a 37°C, de 6 a 8 horas. Posteriormente procedeu-se o enriquecimento seletivo, seguido da etapa de pós-

enriquecimento, inativação e teste de positividade no kit VIP® em duplicata. Os resultados foram expressos como ausência ou presença de 25g.

A contagem de coliformes termotolerantes foi realizada em duplicata nas diluições 10^{-1} a 10^{-3} utilizando-se placas Petrifilm™ da marca 3M, incubando-se a 45°C por 24 horas, sendo que os resultados foram expressos em UFC/g.

Em relação ao *Staphylococcus aureus*, a contagem foi feita utilizando-se as Placas Petrifilm Staph Express da 3M para contagem expressa, em duplicata. Alíquotas de 1 mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) foram inoculadas nas placas e incubadas a 37°C por 24 horas. Os resultados foram expressos em UFC/g.

A contagem das bactérias lácticas foi realizada a partir das diluições 10^{-2} a 10^{-8} , em duplicata, em placas estéreis com Agar MRS (DeMan, Rogosa, Sharpe Agar), fazendo-se a incubação *pour plate* para formar um ambiente de microanaerobiose, ou seja, uma camada fina de MRS, uma de amostra e outra camada de MRS. As colônias foram enumeradas após 72 horas de incubação à temperatura de 37°C e os resultados foram expressos em UFC/g.

3.2.4.9 Análise Sensorial

Com o objetivo de verificar o efeito dos tratamentos com probióticos (na forma livre) nas características sensoriais do salame tipo Italiano do ensaio 1 (pré-teste), o mesmo foi avaliado sensorialmente no tempo 0 (salame maturado). A análise sensorial do ensaio 2 (processamento 4) foi conduzida com o intuito de verificar a aceitação e avaliar os efeitos da incorporação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* nas formas livre e microencapsulada no tempo 0 (salame maturado) e nos salames armazenados por 30, 60 e 90 dias.

As amostras foram avaliadas empregando-se o Teste de Aceitação com escala hedônica de 9 pontos (1= desgostei muitíssimo a 9 = gostei muitíssimo). Foram recrutados 96 consumidores de salame sem restrições quanto ao sexo, idade, classe social e frequência de consumo para o ensaio 1 e 60 consumidores por tempo de armazenamento para o ensaio 2. Utilizando esta escala, foram solicitados a avaliar os atributos sensoriais de aparência, textura, sabor, aceitação global e intenção de compra (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006) (Figura 8).

Nome: _____ Idade: _____

Data: ____/____/____

Ficha nº

1. Por favor, utilizando a escala a abaixo avalie cada amostra de SALAME e marque o quanto você gostou ou desgostou do produto com relação aos seguintes atributos:

| | |
|--------------------------------|-----------------------------|
| 9 - Gostei muitíssimo | 4 - Desgostei ligeiramente |
| 8 - Gostei muito | 3 - Desgostei moderadamente |
| 7 - Gostei moderadamente | 2 - Desgostei muito |
| 6 - Gostei ligeiramente | 1 - Desgostei muitíssimo |
| 5 - Nem gostei / nem desgostei | |

| AMOSTRA Nº | | COMENTÁRIOS |
|------------------|--|-------------|
| Aparência | | |
| Textura | | |
| Sabor | | |
| Aceitação Global | | |

2. Utilizando a escala abaixo, diga se estes SALAMES estivessem à venda e o preço não fosse problema, você:

| | |
|---------------------------------------------|---------------------------------|
| 5 - Certamente compraria | 2 - Provavelmente não compraria |
| 4 - Provavelmente compraria | 1 - Certamente não compraria |
| 3 - Talvez compraria / talvez não compraria | |

| AMOSTRA Nº | |
|------------|--|
| NOTA | |

Figura 8 – Modelo da ficha de avaliação sensorial das amostras de salame tipo Italiano entregue aos provadores durante as seções de análise sensorial

Para cada provador foi servida uma fatia, de aproximadamente, 2 mm de espessura de cada amostra (Figura 9), de forma monádica, juntamente com um copo de água e um biscoito água e sal para serem utilizados entre uma amostra e outra, com a finalidade de limpar o palato.



Figura 9 – Forma de apresentação da amostra de salame tipo Italiano identificada por três dígitos numéricos, servida durante a análise sensorial

Estas análises foram conduzidas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ da Universidade de São Paulo – USP. Os consumidores, em sua maioria, foram representados por alunos, professores e demais colaboradores do *campus*, os quais estavam cientes do experimento conduzido pela concordância com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

Os dados da análise sensorial foram analisados utilizando o software SAS (Statistic Analysis System, versão 9) através de análise de variância (ANOVA), aplicando o teste de *Tukey* com 95% de confiança ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio 1

O ensaio 1 compreende os resultados do pré-teste realizado com o objetivo de verificar o efeito das culturas probióticas na forma livre em algumas características de qualidade do salame tipo Italiano e sua aceitação pelo consumidor.

4.1.1 Cor Instrumental

Considerando os parâmetros de cor observados na massa e no tempo 0 (salame maturado), verificou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os salames com culturas probióticas e o controle (Tabelas 4 e 5).

No início do processamento, conforme resultados apresentados na caracterização da massa do salame, até a obtenção do tempo 0 (salame maturado) observou-se uma redução das médias de L^* do tratamento controle de 56,1 para 41, tratamento *Lactobacillus acidophilus* de 55,5 para 41,1 e tratamento *Bifidobacterium lactis* de 57,3 para 40,5. Este declínio está relacionado com o processo de cura, secagem e maturação dos salames, uma vez que o processo de secagem colabora com o decréscimo de L^* na medida em que ocorre concentração de sólidos no produto pela desidratação, ou seja, os salames escureceram no decorrer do processo de produção (PÉREZ-ALVAREZ et al., 1999). Os valores de L^* obtidos neste experimento foram superiores aos valores de luminosidade 36 encontrados por Garcia, Gagleazzi e Sobral (2000) em salame tipo Italiano após 20 dias de processamento e inferiores aos valores 47,6 e 49,6 observados por Cavenaghi (1999) em salames tipo Italiano de seis diferentes marcas comercializadas no mercado brasileiro.

Com relação à intensidade de vermelho (a^*), observou-se um aumento do tratamento controle de 13,8 para 14,8, tratamento *Lactobacillus acidophilus* de 12 para 15 e tratamento *Bifidobacterium lactis* de 12 para 13,6. Esse aumento do valor de a^* está relacionado ao processo de cura e maturação dos salames. A reação da mioglobina, principal pigmento cárneo, com o óxido nítrico no processo de cura, forma o composto nitrosomioglobina, onde o óxido nítrico está ligado ao ferro heme.

A nitrosomioglobina é o pigmento característico de carnes curadas e é susceptível a oxidação (ZANARDI et al., 2002). O aumento de a^* ao longo do processamento também foi observado por Campagnol (2007) e Garcia, Gagleazzi e Sobral (2000) em salame tipo Italiano. Os valores obtidos estão coerentes com o encontrado em salame tipo Italiano comercializados no Brasil, com a^* variando de 12,7 a 17,6 (CAVENAGHI, 2005), porém um pouco menores aos valores de 17,5 a 17,8 observado por Garcia, Gagleazzi e Sobral (2000) e de 24,87 observado por Santa (2008) em salames tipo Italiano.

Ao contrário de a^* , a intensidade de amarelo (b^*) apresentou um decréscimo acentuado durante a maturação. A média de b^* decresceu do tratamento controle de 14,5 para 6,7, tratamento *Lactobacillus acidophilus* de 13,4 para 6,6 e tratamento *Bifidobacterium lactis* de 13,7 para 6. Esta diferença de 7,5 pontos na escala equivale a uma redução de 54% no valor de b^* . O decréscimo do valor b^* observado ao longo dos dias de processo se deve provavelmente ao consumo de oxigênio pelos microrganismos da cultura *starter* durante sua fase de crescimento exponencial, e conseqüentemente, ao decréscimo de oximioglobina, que contribuiu consideravelmente ao decréscimo do valor de b^* . Além disso, a reação do óxido nítrico com a mioglobina para formar nitrosomioglobina também contribuiu para o decréscimo das concentrações de mioglobina e oximioglobina presentes, o que conduz na redução de b^* (PÉREZ-ALVAREZ et al., 1999).

Em função desses resultados, é possível afirmar que os probióticos não interferiram na cor dos salames.

Tabela 4 – Médias (\pm desvios padrões) de L*, a*, b*, pH, Aw e Acidez das massas por tratamento

| Tratamentos | L* | a* | b* | pH | pH (pós fermentação) | Aw | Acidez (g de ácido lático/100g) |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| C | 56,1 \pm 2,33 ^a | 13,8 \pm 1,279 ^a | 14,5 \pm 1,241 ^a | 5,97 \pm 0,035 ^a | 5,28 \pm 0,015 ^a | 0,97 \pm 0,006 ^b | 0,09 \pm 0,002 ^c |
| La | 55,5 \pm 1,081 ^a | 12 \pm 0,801 ^a | 13,4 \pm 0,446 ^a | 5,96 \pm 0,038 ^a | 4,67 \pm 0,04 ^b | 0,98 \pm 0,003 ^a | 0,12 \pm 0,001 ^b |
| BI | 57,3 \pm 2,062 ^a | 12 \pm 1,36 ^a | 13,7 \pm 0,828 ^a | 5,88 \pm 0,059 ^a | 4,58 \pm 0,021 ^c | 0,99 \pm 0,002 ^a | 0,14 \pm 0,001 ^a |

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

C - tratamento sem adição de probióticos; La – tratamento com adição de *Lactobacillus acidophilus*; BI – tratamento com adição de *Bifidobacterium lactis*.

Tabela 5 – Médias (\pm desvios padrões) de L*, a*, b*, pH, Aw e Acidez do tempo 0 (salame maturado) por tratamento

| Tratamentos | L* | a* | b* | pH | Aw | Acidez (g de ácido lático/100g) |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| C | 41 \pm 2,944 ^a | 14,8 \pm 0,903 ^a | 6,7 \pm 1,017 ^a | 5,23 \pm 0,021 ^a | 0,89 \pm 0,001 ^a | 0,19 \pm 0,001 ^c |
| La | 41,1 \pm 0,493 ^a | 15 \pm 0,913 ^a | 6,6 \pm 0,534 ^a | 4,8 \pm 0,036 ^b | 0,87 \pm 0,006 ^b | 0,26 \pm 0,002 ^b |
| BI | 40,5 \pm 0,699 ^a | 13,6 \pm 1,041 ^a | 6 \pm 0,386 ^a | 4,71 \pm 0,012 ^c | 0,84 \pm 0,005 ^c | 0,29 \pm 0,001 ^a |

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

C - tratamento sem adição de probióticos; La – tratamento com adição de *Lactobacillus acidophilus*; BI – tratamento com adição de *Bifidobacterium lactis*.

4.1.2 Avaliação do pH

A ANOVA dos valores de pH das massas mostrou que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as médias de pH dos três salames, e variaram entre 5,88 e 5,97 (Tabela 4).

Ao final da fermentação, os tratamentos com *Lactobacillus acidophilus* (La) e *Bifidobacterium lactis* (Bl) apresentaram pH 4,67 e 4,58 significativamente inferior ($p \leq 0,05$) ao tratamento controle com 5,28 em decorrência da atividade metabólica das culturas lácticas adicionadas, decorrente da fermentação de hexoses com produção de ácidos, fato também argumentado por Bruna et al. (2001). O pH do salame tipo Italiano variou entre 4,58 e 5,28 na fermentação (Tabela 4), chegando a 4,71-5,23 no salame maturado (Tabela 5). Este resultado é similar aos valores de pH 5-5,2 reportados por Sameshima et al. (1998) em salames adicionados de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* para o mesmo período de fermentação. Estas variações podem ter sido decorrentes da matéria-prima e formulação empregadas.

Após a fermentação e secagem, os salames com culturas probióticas La e Bl tiveram seus valores de pH elevados de 4,67 a 4,8 e 4,58 a 4,71, respectivamente. Esse aumento no valor do pH deve-se provavelmente ao aumento da atividade proteolítica, com a formação de peptídeos, aminoácidos e compostos nitrogenados não protéicos (HERRANZ et al., 2003; DURÁ; FLORES; TOLDRÁ, 2004) e está de acordo com o encontrado em vários outros salames fermentados (GRECO et al., 2005). Comportamento semelhante foi observado na produção de embutidos fermentados e secos (MACEDO et al., 2008; OLESEN, MEYER; STAHNKE, 2004), em salame tipo Italiano (GARCIA, GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000) e em embutidos fermentados semi-secos (HUGHES et al., 2002).

Os resultados da avaliação do pH mostraram que a fermentação no salame com *Bifidobacterium lactis* foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) ao controle e ao salame com *Lactobacillus acidophilus*, verificando-se, neste tratamento, uma produção mais rápida e efetiva de ácido láctico e acético, com conseqüente redução de pH (Tabela 4). Por sua vez, a redução do pH proporcionou o alcance do ponto isoelétrico da proteína da carne e a aproximação de suas moléculas fez com que a perda de água neste tratamento (Bl) fosse facilitada (discutido posteriormente no item 4.1.5). Este fato, também, se refletiu nos resultados da aceitação da textura,

onde o salame adicionado com *Bifidobacterium lactis*, obteve uma aceitação média significativamente inferior ($p \leq 0,05$) ao controle e ao salame com *Lactobacillus acidophilus* (discutido posteriormente no item 4.1.6).

4.1.3 Determinação da Atividade de Água (A_w)

Os valores de atividade de água observados na massa detectaram diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos com probióticos e o tratamento controle com médias de 0,98 e 0,99 para os tratamentos La e BI, respectivamente e média 0,97 para o tratamento controle (Tabela 4). No tempo 0 (salame maturado) também foi observada diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. O tratamento controle obteve média de 0,89, enquanto os tratamentos La e BI obtiveram valores médios de 0,87 e 0,84, respectivamente. Os menores valores da atividade de água (La e BI) se relacionam à diminuição do pH. Quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas (5-5,2), ocorre uma diminuição na capacidade de retenção de água, facilitando a desidratação e conseqüentemente, a redução da A_w dos salames (MAURIELLO et al., 2004).

O valor de pH relativamente baixo e a atividade de água intermediária inibem a multiplicação de microrganismos patogênicos e muitos deteriorantes, o que contribui para a qualidade e estabilidade do produto.

Os três tratamentos apresentaram valores de atividade de água abaixo do nível máximo de 0,90, recomendado pela legislação brasileira para os salames tipo Italiano (BRASIL, 2000). Os valores obtidos neste estudo estiveram próximos de 0,87-0,88, observados nos trabalhos de Garcia, Gagleazzi e Sobral (2000) e Zlender et al. (2009), e coerentes com o de Herrero et al. (2007), que observaram valores entre 0,83 e 0,89.

4.1.4 Acidez em Ácido Lático

Nas Tabelas 4 e 5 são apresentados os valores de acidez láctica da massa e do tempo 0 (salame maturado). Observa-se que a acidez aumentou durante o processo de fabricação do salame de 0,09-0,14 a 0,19-0,29 g de ácido láctico, fato que pode

ser atribuído à produção de ácido lático pelas bactérias lácticas. Nos salames que receberam adição de culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, observou-se que a acidez foi significativamente superior ($p \leq 0,05$) ao tratamento controle. Isto se deve ao fato que estes tratamentos continham cultura *starter* mais cultura probiótica, ou seja, 1% a mais de bactérias em relação ao tratamento controle que só recebeu a cultura *starter*, indicando uma maior atividade fermentativa sobre os açúcares (sacarose e glicose) em maior proporção e que há coerência entre os parâmetros de pH, Aw e acidez analisados nesta pesquisa.

Assim sendo, a maior acidez observada nos tratamentos La e Bl, decorrente da adição de cultura *starter* mais culturas probióticas e da maior atividade metabólica das bactérias lácticas, mostra-se diretamente relacionada com a diminuição do pH no período de fermentação do salame, resultados que estão de acordo com os reportados por Bacus (1986).

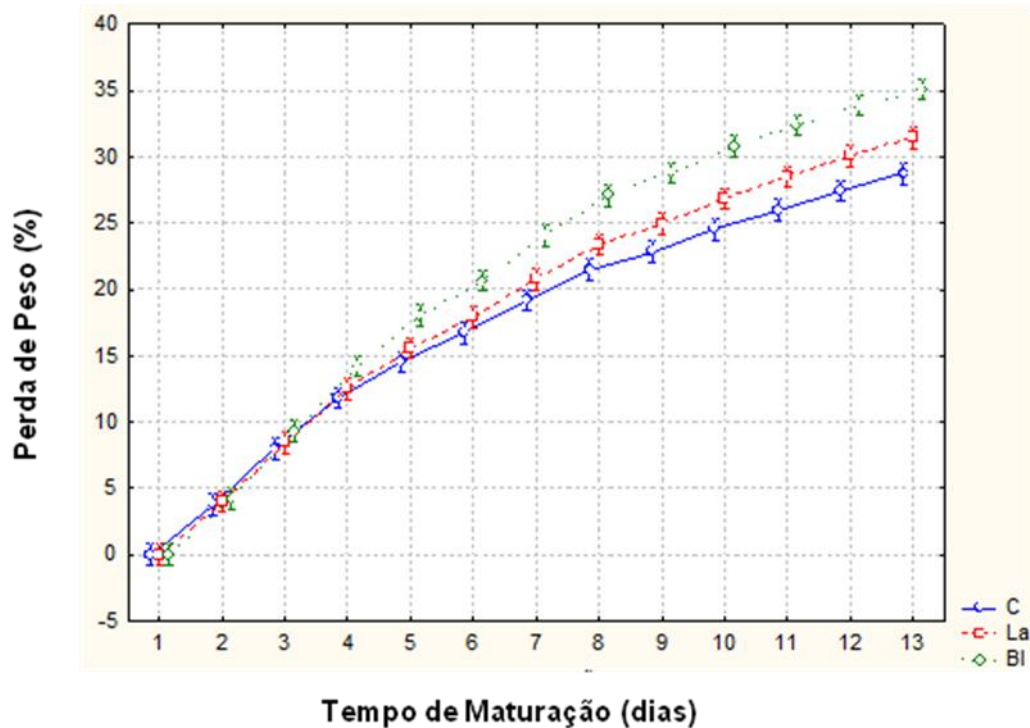
4.1.5 Determinação da Perda de Peso

Na análise da variância dos dados de perda de peso, houve efeito significativo de tratamento ($p \leq 0,05$), tempo de maturação ($p \leq 0,05$) e efeito de interação do tratamento x tempo de maturação ($p \leq 0,05$).

A Figura 9 mostra a perda de peso dos salames durante os 13 dias de fermentação e secagem. Nesta figura, se observa claramente o comportamento exponencial das curvas da perda de peso, onde o tratamento com adição de *Bifidobacterium lactis* apresenta a maior taxa de perda de peso (35,1%) no período de secagem, seguida do tratamento com adição de *Lactobacillus acidophilus* (31,5%) e, com menor taxa, o tratamento controle (28,7%).

A maior perda de peso obtida nos tratamentos adicionados com culturas probióticas está relacionada à maior acidificação da massa, que facilita a perda de peso das amostras. Por sua vez, esta condição está relacionada ao menor valor de pH encontrado nestes tratamentos, que ocasionou uma maior perda de água durante o processamento, haja vista que o pH é um dos principais fatores que influenciam na difusão da água do interior para a superfície do salame. Outros autores obtiveram perda de peso entre 27 e 32% (GØTTERUP et al., 2008; ZANARDI et al., 2002), 35 e 45% (CIROLINI, 2008; ZLENDER et al., 2009) e 59%

(CAMPAGNOL, 2007), mostrando a grande variabilidade entre os processamentos de embutidos cárneos fermentados e secos, que pode ser decorrente da formulação, matéria-prima, processo, entre outros.



C: controle; La: *Lactobacillus acidophilus*; BI: *Bifidobacterium lactis*.

Figura 10 - Perda de Peso (%) das amostras de salame Tipo italiano durante os 13 dias de secagem

Após o período de secagem, os salames foram armazenados em embalagem a vácuo, não permitindo trocas gasosas com o exterior. Por esta razão, a perda de peso não foi determinada durante o armazenamento.

A determinação da perda de peso de embutidos secos como o salame é uma medida que mostra indiretamente a quantidade de água eliminada pelo embutido durante o período de secagem e depende da temperatura, umidade relativa, velocidade do ar no interior da câmara de maturação e do tempo de processamento (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

Através do exposto, verifica-se que a incorporação de culturas probióticas apresentou efeito significativo ($p \leq 0,05$) durante o processo de secagem do salame tipo Italiano, sendo mais evidente a perda de peso no tratamento com adição de *Bifidobacterium lactis*. Os valores obtidos nos tratamentos com probióticos *Bifidobacterium lactis* (35,1%) e *Lactobacillus acidophilus* (31,5%) estão dentro dos

parâmetros (30 a 40%) considerados ideais, relatados por Rust (1994), uma vez que perdas de peso maiores que esses valores dificultam a viabilidade econômica dos embutidos fermentados.

4.1.6 Análise Sensorial

A adição de outras culturas além das culturas *starters* tradicionais poderia causar um impacto negativo nas propriedades sensoriais no salame. Para verificar se a adição das culturas probióticas afeta as características sensoriais dos salames desenvolvidos, realizou-se um teste de aceitação com 96 consumidores.

Os resultados da análise da variância (ANOVA) dos dados de aceitação mostram que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nas médias de aceitação da aparência, sabor e aceitação global dos salames. Entretanto, foram detectadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na aceitação da textura (Tabela 6).

Tabela 6 – Média (\pm desvios padrões) dos atributos aparência, textura, sabor e aceitação global nas amostras de salame tipo Italiano ($n=96$ consumidores)

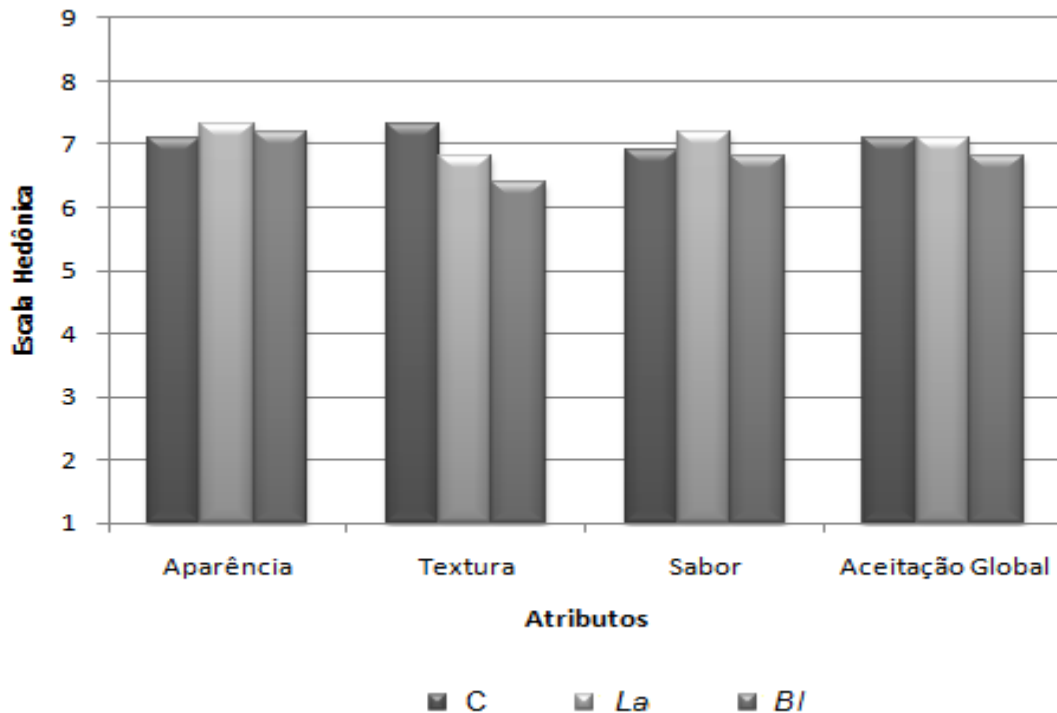
| Atributos | Tratamentos | | |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | C | La | Bl |
| Aparência | 7,1 \pm 1,59 ^a | 7,3 \pm 1,34 ^a | 7,2 \pm 1,28 ^a |
| Textura | 7,3 \pm 1,47 ^a | 6,8 \pm 1,71 ^a | 6,4 \pm 1,67 ^b |
| Sabor | 6,9 \pm 1,81 ^a | 7,2 \pm 1,65 ^a | 6,8 \pm 1,65 ^a |
| Aceitação global | 7,1 \pm 1,47 ^a | 7,1 \pm 1,41 ^a | 6,8 \pm 1,45 ^a |

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

C: Controle; La: *Lactobacillus acidophilus*; Bl: *Bifidobacterium lactis*.

Observa-se que os salames com culturas probióticas obtiveram aceitação similar à do salame controle, apresentando na avaliação da aparência, sabor e aceitação global, notas médias em torno de 7 (gostei moderadamente). Já para a textura, o salame com *Bifidobacterium lactis* obteve uma média de 6,4 (gostei ligeiramente), significativamente inferior ($p \leq 0,05$) ao controle e ao salame com

Lactobacillus acidophilus, que obtiveram aceitação média de 7,3 e 6,8, respectivamente, classificados como “gostei moderadamente” (Figura 11). Este resultado pode ser atribuído ao fato da BI produzir outros ácidos que não o láctico, tais como o acético e o succínico, que podem afetar a qualidade sensorial do produto, e logo sua aceitação.



C: Controle; La: *Lactobacillus acidophilus*; BI: *Bifidobacterium lactis*.
 1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei / nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.
 Figura 11 – Valores médios dos atributos aparência, textura, sabor e aceitação global nas amostras de salame tipo Italiano

Mesmo assim, os salames com culturas probióticas, obtiveram em geral boa aceitação entre os consumidores, especialmente o salame com *Lactobacillus acidophilus*, que obteve em todos os atributos uma média de aceitação em torno de 7 na escala hedônica, semelhante ao salame controle. Isto indica que os salames desenvolvidos nesta pesquisa teriam um grande potencial de venda no mercado consumidor.

Estes resultados foram similares aos de outras pesquisas que foram conduzidas adicionando culturas probióticas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* ao salame, os quais não influenciaram negativamente nas suas características de sabor (ANDERSEN, 1998). Além disso,

em um experimento sensorial os microrganismos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis* foram aplicados em salame juntamente com a cultura *starter* tradicional utilizada para carnes. Concluiu-se que nenhuma destas culturas probióticas afetaram negativamente as propriedades sensoriais (PIDCOCK; HEARD; HENRIKSSON, 2002).

As análises de correlação entre a aceitação global e a aparência, a textura e o sabor, resultaram em correlações positivas significativas ($p \leq 0,05$). Observou-se que o atributo que mais influenciou na aceitação da qualidade global dos salames foi o sabor ($r=0,84$), seguida da textura ($r=0,71$), sendo a aparência o atributo que menos influenciou ($r=0,50$). Estes resultados são importantes porque mostram que o sabor e a textura são os atributos que os consumidores mais apreciam quando avaliam um salame e que provavelmente influenciarão também na decisão de compra.

A Tabela 7 mostra os resultados da intenção de compra dos consumidores para os três salames. A maior porcentagem de aceitação (provavelmente/certamente compraria) dos consumidores entrevistados foi do salame com *Lactobacillus acidophilus* com 64,6%, já o salame com *Bifidobacterium lactis* apresentou uma porcentagem de 53,1% e o salame controle de 58,3%.

Tabela 7 – Intenção de compra dos consumidores (em %) para salames com probióticos e salame comercial (controle) (n= 96 consumidores)

| Intenção de compra (%) | Tratamentos | | |
|-----------------------------|-------------|------|------|
| | C | La | Bl |
| Certamente não compraria | 6,3 | 4,2 | 6,3 |
| Provavelmente não compraria | 11,5 | 9,4 | 11,5 |
| Compraria ou não | 24 | 21,9 | 29,2 |
| Provavelmente compraria | 22,9 | 30,2 | 32,3 |
| Certamente compraria | 35,4 | 34,4 | 20,8 |

C: controle; La: *Lactobacillus acidophilus*; Bl: *Bifidobacterium lactis*.

1= certamente não compraria; 2= provavelmente não compraria; 3= talvez compraria / talvez não compraria; 4= provavelmente compraria; 5= certamente compraria.

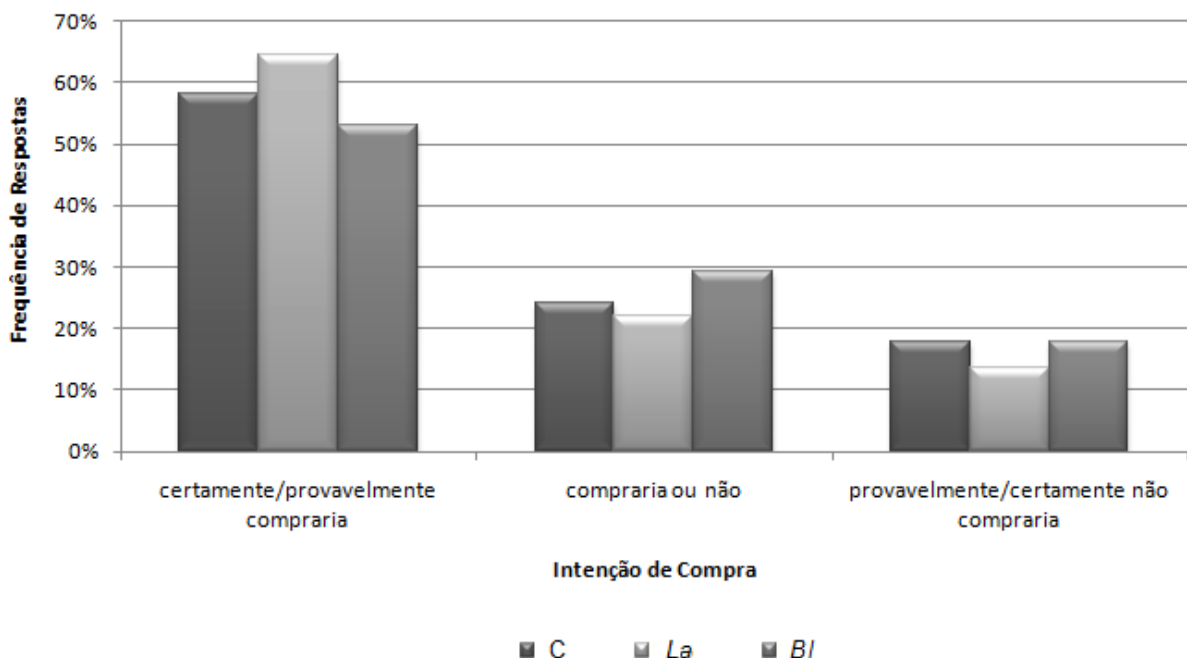
Do total de consumidores entrevistados, a maior porcentagem de indiferença (compraria ou não) na intenção de compra foi do tratamento *Bifidobacterium lactis*

com 29,2%, seguido do tratamento *Lactobacillus acidophilus* com 24% e do controle com 21,9%. Quanto à rejeição (certamente/provavelmente não compraria) ambos os tratamentos controle e *Bifidobacterium lactis* apresentaram 17,8%, por sua vez, o salame com *Lactobacillus acidophilus* obteve 13,6% (Figura 12).

A menor taxa de intenção de compra para o salame com *Bifidobacterium lactis* pode ser devido a uma menor aceitação em sua textura. Este fato deve-se provavelmente ao valor de 0,84 de atividade de água obtido, facilitando a desidratação e tornando a amostra mais dura.

No entanto, para os três salames, mais de 50% dos consumidores entrevistados manifestaram estar dispostos a comprar estes produtos, comprovando a alta aceitação dos salames com probióticos.

Os resultados da avaliação da intenção da compra mostram que os salames probióticos têm um grande potencial de venda no mercado já que o consumidor está disposto a comprar este tipo de produto. Provavelmente a intenção de compra aumentaria ainda mais se os consumidores fossem informados das vantagens e benefícios que os alimentos probióticos trazem à saúde.



C: controle; La: *Lactobacillus acidophilus*; Bl: *Bifidobacterium lactis*.

Figura 12 – Intenção de compra dos consumidores (em %) para salames com probióticos e salame comercial (controle) (n= 96 consumidores)

4.1.7 Considerações finais sobre o Ensaio 1

Os resultados deste ensaio permitem concluir que a utilização das culturas probióticas interferiu positivamente nas avaliações físico-químicas e sensoriais. Os valores de pH, acidez, Aw e perda de peso estão dentro dos parâmetros considerados ideais para a obtenção do embutido fermentado. A menor taxa de intenção de compra para o salame com *Bifidobacterium lactis* pode ser devido a uma menor aceitação em sua textura, provavelmente pelo valor de 0,84 de atividade de água obtido, facilitando a desidratação e tornando a amostra mais dura.

A adição de probióticos foi vantajosa, uma vez que os salames, tipo Italiano, apresentaram um desempenho similar e uma alta aceitação entre os consumidores, quando comparados ao controle.

4.2 Ensaio 2

O ensaio 2 compreende o resultado de quatro processamentos realizados, separadamente, com o objetivo de verificar o efeito das culturas probióticas nas formas livre e microencapsulada nas características de qualidade do salame tipo Italiano, até 150 dias de armazenamento. As características de processamento foram iguais às realizadas para o ensaio 1, com exceção dos tratamentos e formulação empregada, conforme especificado na Tabela 2.

4.2.1 Cor Instrumental

De acordo com a análise de variância dos valores de L* (luminosidade) da massa dos salames (Tabela 8), constatou-se que não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os salames com probióticos e o controle, com médias que variaram de 61,2 a 63,1. Considerando-se as médias da massa até o tempo 0 (salame maturado), observou-se um declínio para todos os tratamentos, de forma idêntica. Com isso, é possível afirmar que os probióticos sejam na forma livre ou encapsulada, não influenciaram a luminosidade dos salames. Este declínio ocorreu em consequência do processo de cura, secagem e maturação dos salames.

Principalmente o processo de secagem colabora com o decréscimo de L^* na medida em que ocorre concentração de sólidos no produto pela desidratação. Essa afirmação se confirmou na comparação das médias destes tratamentos com as médias da atividade de água (discutido posteriormente no item 4.2.4).

Tabela 8 – Média (\pm desvios padrões) de L^* nas amostras de salame tipo Italiano, segundo tratamento e tempo de armazenamento

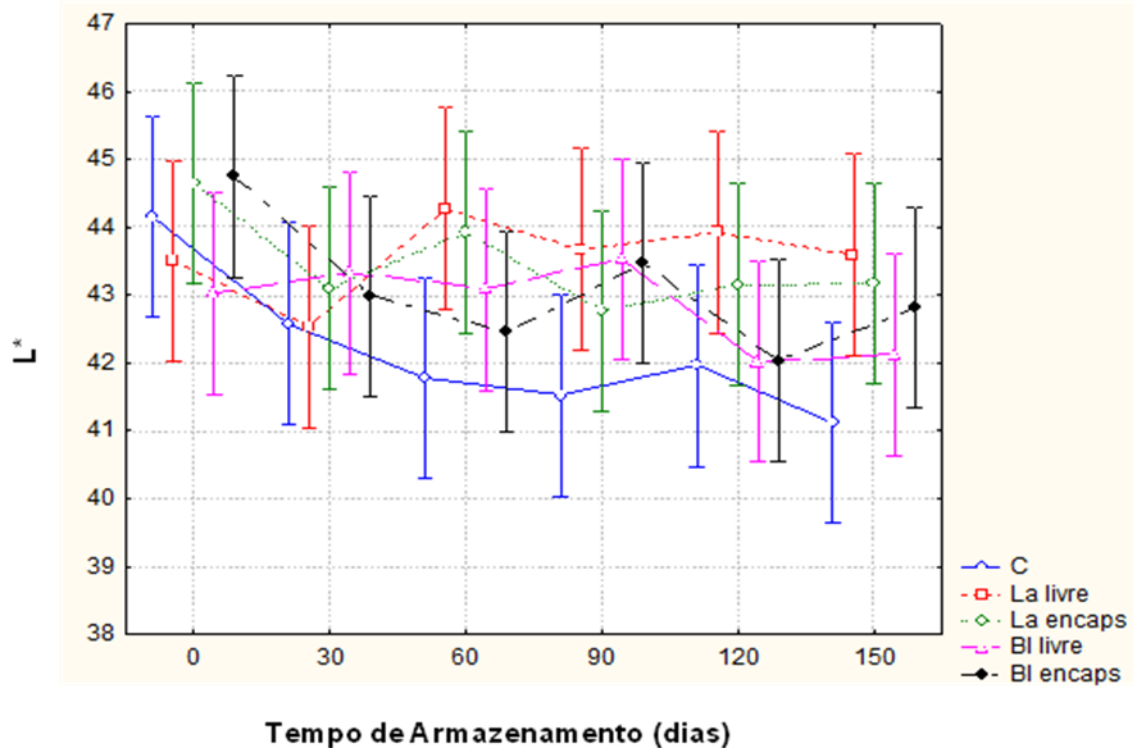
| Tempo de Armazenamento (dias) | Tratamentos | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| massa | 61,6 \pm 5,63 ^a | 62 \pm 1,63 ^a | 61,2 \pm 3,46 ^a | 63,1 \pm 4,76 ^a | 62 \pm 3,78 ^a |
| 0 | 44,2 \pm 1,38 ^{AA} | 43,5 \pm 1,26 ^{AA} | 44,6 \pm 1,84 ^{AA} | 43 \pm 0,76 ^{AA} | 44,7 \pm 0,96 ^{AA} |
| 30 | 42,6 \pm 1,41 ^{AA} | 42,5 \pm 2,24 ^{AA} | 43,1 \pm 1,44 ^{AA} | 43,3 \pm 1,5 ^{AA} | 43 \pm 0,95 ^{AA} |
| 60 | 41,8 \pm 1,08 ^{AA} | 44,3 \pm 1,12 ^{AA} | 43,9 \pm 0,62 ^{AA} | 43,1 \pm 0,84 ^{AA} | 42,5 \pm 1,73 ^{AA} |
| 90 | 41,5 \pm 0,89 ^{AA} | 43,7 \pm 1,44 ^{AA} | 42,8 \pm 0,45 ^{AA} | 43,5 \pm 0,29 ^{AA} | 43,5 \pm 0,92 ^{AA} |
| 120 | 42 \pm 0,8 ^{AA} | 43,9 \pm 1,28 ^{AA} | 43,2 \pm 0,6 ^{AA} | 42 \pm 1,32 ^{AA} | 42 \pm 0,3 ^{AA} |
| 150 | 41,1 \pm 2,82 ^{AA} | 43,6 \pm 2,13 ^{AA} | 43,2 \pm 0,48 ^{AA} | 42,1 \pm 0,79 ^{AA} | 42,8 \pm 0,95 ^{AA} |

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

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

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

A luminosidade dos salames T2 e T3 decresceram no tempo 30, com posterior aumento no 60° dia, entretanto não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 13). A variação observada pode ser decorrente da heterogeneidade do produto. As partículas de gordura evidentes ao se cortar o salame, mesmo com as medições não sendo realizadas sobre elas, podem contribuir com valores superestimados.



C: controle (T1); La livre: *Lactobacillus acidophilus* livre (T2); La encaps: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3); BI livre: *Bifidobacterium lactis* livre (T4); BI encaps: *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5).

Figura 13 - Valores médios de L* nas amostras de salame tipo Italiano, por tratamento e tempo de armazenamento

Ao longo do período de armazenamento (150 dias), embora todas as amostras tenham evidenciado um decréscimo nos valores de L*, verificou-se que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) durante a vida útil, ou seja, o L* ficou estável durante todo o armazenamento. Isto sugere que a incorporação de culturas probióticas livre e microencapsulada não interferem na luminosidade dos salames durante sua vida útil.

O decréscimo de L* nas amostras representa a formação da cor escura em decorrência de reações de escurecimento, segundo Bozkurt e Bayram (2006). Estes resultados concordam aos resultados obtidos por Kayaardi e Gök (2003) que verificaram que os valores de L* de salames geralmente decrescem durante o período de maturação, por sua vez, estão abaixo do valor 47,8 encontrado por Barbut (2003) em salame tipo Húngaro.

O parâmetro L* é muito variável em salames tipo Italiano comercializados no Brasil, o qual pode variar de 35,1 (CAVENAGHI, 2005) a 49,67 (CAVENAGHI;

OLIVEIRA, 1999). Em salames típicos italianos, também foram observados valores de L^* de 45,7 (DEL NOBILE et al., 2009). Com isso, os valores médios obtidos, apesar de algumas variações, encontram-se coerentes com os valores normalmente encontrados na literatura.

Conforme os resultados da análise da variância dos valores de a^* da massa (Tabela 9) observou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os salames com culturas probióticas e o controle. A maior média apresentada para a massa foi de 17,1 para o tratamento controle (T1) seguido de 15,7 do tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2). Considerando que a cor vermelha pode ser utilizada como indicador de estabilidade de cor em carne e produtos cárneos, constatou-se que também não houve diferença significativa ($p>0,05$) durante a vida útil.

Tabela 9 – Média (\pm desvios padrões) de a^* nas amostras de salame tipo Italiano, segundo tratamento e tempo de armazenamento

| Tempo de Armazenamento (dias) | Tratamentos | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| massa | 17,1 \pm 2,25 ^a | 15,7 \pm 0,98 ^a | 14,7 \pm 1,17 ^a | 14,5 \pm 0,99 ^a | 15,2 \pm 1,67 ^a |
| 0 | 17 \pm 1,13 ^{aA} | 16,7 \pm 0,57 ^{aA} | 17,1 \pm 0,68 ^{aA} | 17,4 \pm 1,44 ^{aA} | 16,8 \pm 0,75 ^{aA} |
| 30 | 17,4 \pm 1,35 ^{aA} | 17,2 \pm 0,84 ^{aA} | 17,3 \pm 1,03 ^{aA} | 17,2 \pm 1,1 ^{aA} | 17,9 \pm 0,7 ^{aA} |
| 60 | 18,6 \pm 0,42 ^{aA} | 16,9 \pm 0,76 ^{aA} | 17,7 \pm 0,62 ^{aA} | 17,7 \pm 1,44 ^{aA} | 18,1 \pm 0,73 ^{aA} |
| 90 | 18 \pm 0,65 ^{aA} | 17,5 \pm 1,3 ^{aA} | 18,5 \pm 0,64 ^{aA} | 17,4 \pm 0,95 ^{aA} | 18,3 \pm 0,98 ^{aA} |
| 120 | 18,3 \pm 0,7 ^{aA} | 18 \pm 0,85 ^{aA} | 18,4 \pm 0,79 ^{aA} | 18,1 \pm 0,96 ^{aA} | 17,8 \pm 0,68 ^{aA} |
| 150 | 18,2 \pm 0,6 ^{aA} | 17,4 \pm 1,47 ^{aA} | 18,5 \pm 0,36 ^{aA} | 17,9 \pm 0,5 ^{aA} | 18,6 \pm 0,2 ^{aA} |

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

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

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

Conforme os resultados na Tabela 9, para o tempo 0 (salame maturado) observa-se um aumento no valor de a^* para os tratamentos T2, T3, T4 e T5, que corresponde à secagem e, portanto, este aumento deve ser devido à redução no

teor de água das amostras que diminui a reflexão conferindo aparência escura aos produtos e aumenta a concentração de nitrosomioglobina.

Com o fim do processo de fermentação e secagem, o tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4) apresentou uma redução no valor de a^* de 17,4 para 17,2 (30 dias de armazenamento). Por sua vez, com 60 dias de armazenamento, o tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), também apresentou uma redução em seus valores de a^* de 17,2 para 16,9. Estas diminuições são atribuídas ao efeito do ácido láctico nos diferentes estágios químicos da mioglobina (mioglobina, nitrosomioglobina e oximioglobina), pois este ácido pode desnaturar parcial ou totalmente o grupo prostético heme.

Com 30 dias de armazenamento, as amostras do tratamento controle (T1) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) apresentaram as maiores médias de a^* , 17,4 e 17,9, respectivamente, e intensificando-se até o tempo de 150 dias. Este fato é positivo para a aparência dos salames, uma vez que receberam notas acima de 7 (gostei moderadamente) para este atributo na análise sensorial (discutido posteriormente no item 4.3).

Ao término do armazenamento, os salames dos cinco tratamentos apresentaram resultados coerentes com os observados por Garcia; Gagleazzi e Sobral (2000) em salame tipo Italiano, com valores entre 17,5 a 17,8.

Para a intensidade de amarelo (b^*) constatou-se que nos resultados da análise da variância (Tabela 10) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos, apresentando na massa médias que variaram de 14,3 a 15 para 8,6 a 9,5 no tempo 0 (salame maturado). A intensidade de amarelo (b^*) decresceu durante a fermentação e secagem, supostamente devido ao consumo de oxigênio presente na mistura pelos microrganismos na sua fase exponencial de crescimento, deste modo contribuindo para o decréscimo de mioglobina na forma de oximioglobina, que neste estágio da mioglobina, contribui na formação da cor vermelha do produto.

Tabela 10 – Média (\pm desvios padrões) de b* nas amostras de salame tipo Italiano, segundo tratamento e tempo de armazenamento

| Tempo de Armazenamento (dias) | Tratamentos | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| massa | 15 \pm 0,4 ^a | 14,9 \pm 0,58 ^a | 14,3 \pm 1,14 ^a | 14,5 \pm 0,82 ^a | 14,8 \pm 0,58 ^a |
| 0 | 9,5 \pm 0,64 ^{ab} | 8,6 \pm 0,51 ^{ab} | 9,5 \pm 0,97 ^{ab} | 9,1 \pm 1,13 ^{aa} | 9,5 \pm 0,33 ^{ab} |
| 30 | 9,7 \pm 0,37 ^{ab} | 9,3 \pm 0,8 ^{ab} | 9,8 \pm 1,06 ^{ab} | 9,2 \pm 0,81 ^{aa} | 10 \pm 0,61 ^{ab} |
| 60 | 10,7 \pm 0,25 ^{ab} | 9,4 \pm 0,26 ^{ab} | 10,6 \pm 0,65 ^{ab} | 10,1 \pm 0,96 ^{aa} | 10,6 \pm 0,58 ^{ab} |
| 90 | 10,6 \pm 0,19 ^{ab} | 10,4 \pm 0,92 ^{ab} | 11,6 \pm 0,51 ^{ab} | 10,7 \pm 1,33 ^{aa} | 11,4 \pm 0,78 ^{ab} |
| 120 | 11,3 \pm 0,36 ^{aa} | 12 \pm 1,63 ^{aa} | 11,7 \pm 1,57 ^{ab} | 11,3 \pm 1,45 ^{aa} | 10,9 \pm 1,08 ^{ab} |
| 150 | 11,6 \pm 1,01 ^{aa} | 10,7 \pm 0,57 ^{ab} | 12,3 \pm 1,03 ^{aa} | 11,6 \pm 0,90 ^{aa} | 12,3 \pm 0,59 ^{aa} |

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

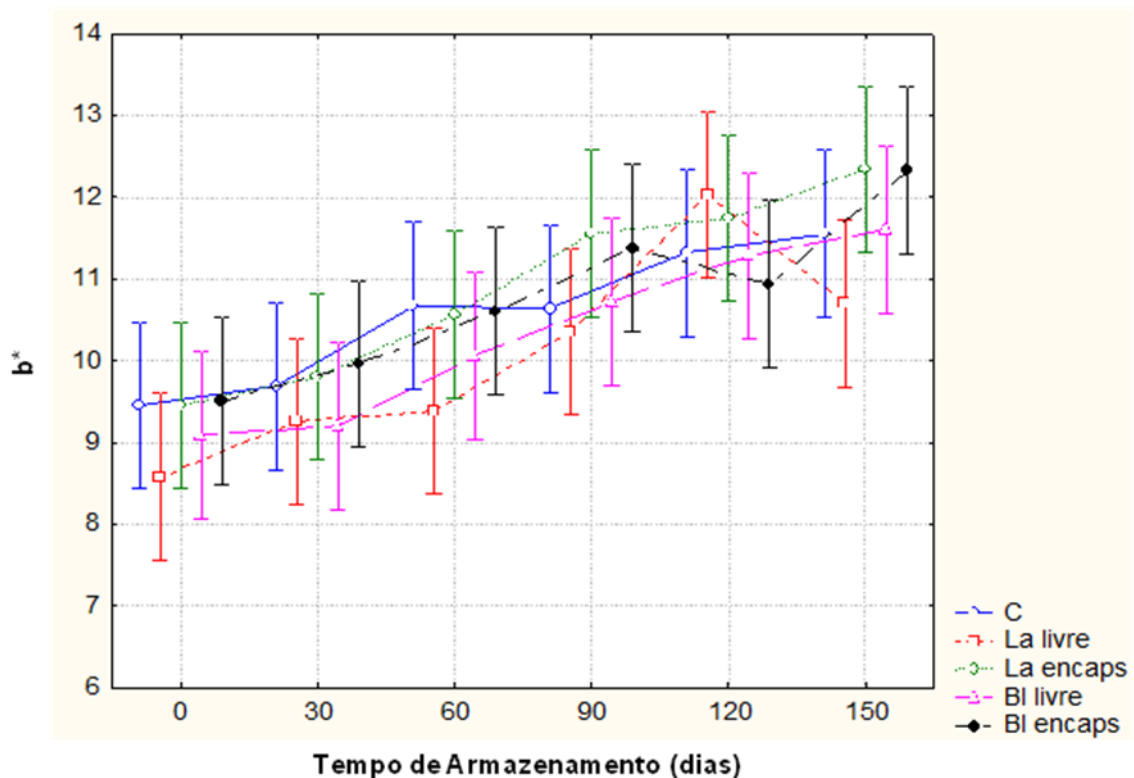
Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

Do tempo 0 (salame maturado) até os 120 dias de armazenamento, a intensidade de amarelo aumentou para os tratamentos T1, T2, T3 e T4. Por sua vez, o único tratamento que teve a sua média reduzida foi o tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) com 10,9, provavelmente este resultado pode ser decorrente da oxidação lipídica, que tende a aumentar a cor amarela do produto pela rancidez (GARCÍA-ESTEBAN; ANSORENA; ASTIASARÁN, 2004), já que um pequeno aumento foi observado no valor de TBARS neste mesmo período para este tratamento.

Conforme a Tabela 10 observa-se que apenas o tempo contribuiu de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5). Entretanto, para o tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4) não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$) durante a vida útil.

Os valores de b^* reduziram-se ao longo do armazenamento em média 28,2% para o tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), 22,7% para o controle (T1), 20% para *Bifidobacterium lactis* livre (T4), 16,9% para *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) e 14% para *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3), resultando em valores médios de 10,7 a 12,3 (Figura 14). Estes resultados estão acima dos relatados por Barbut (2003) que avaliou a cor de um salame tradicional e de um salame tipo Húngaro obtendo valores de b^* de 10,3 e 8,5, respectivamente, e semelhantes aos obtidos por Pérez-Alvarez et al. (1999), que observaram a diminuição dos valores de b^* de um embutido curado tipo Espanhol, atribuindo este decréscimo ao consumo de oxigênio pelos microrganismos e a consequente diminuição da oximioglobina.



C: controle (T1); La livre: *Lactobacillus acidophilus* livre (T2); La encaps: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3); BI livre: *Bifidobacterium lactis* livre (T4); BI encaps: *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5).

Figura 14 - Valores médios de amarelo (b^*) nas amostras de salame tipo Italiano, por tratamento e tempo de armazenamento

4.2.2 Avaliação do pH

Considerando os resultados da análise de variância da massa de salame, verifica-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias dos cinco tratamentos, que variaram de 6,2 a 6,3 (Tabela 11) e que está coerente com a variação de 6,35 a 6,65 observada por Del Nobile et al. (2009) para salames italianos, que podem ser decorrentes da matéria-prima e formulação empregadas. Durante a fermentação, três grandes grupos de substâncias presentes influenciam os valores de pH: os ácidos orgânicos oriundos da fermentação dos açúcares, os compostos básicos resultantes da proteólise gerada pelos microrganismos ou pelas próprias enzimas tissulares e os ácidos orgânicos procedentes da hidrólise das gorduras (Chagas, 1998, citado por Macedo, 2005).

Tabela 11 – Média (\pm desvios padrões) de pH nas amostras de salame tipo Italiano, segundo tratamento e tempo de armazenamento

| Tempo de Armazenamento (dias) | Tratamentos | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| massa | 6,2 \pm 0,24 ^a | 6,2 \pm 0,25 ^a | 6,3 \pm 0,17 ^a | 6,3 \pm 0,06 ^a | 6,3 \pm 0,22 ^a |
| pós fermentação | 5,2 \pm 0,01 ^a | 4,7 \pm 0,13 ^b | 5 \pm 0,12 ^{ab} | 4,6 \pm 0,17 ^b | 5,2 \pm 0,06 ^a |
| 0 | 5,3 \pm 0,1 ^{aB} | 4,8 \pm 0,21 ^{bA} | 5,2 \pm 0,06 ^{aB} | 4,8 \pm 0,07 ^{bA} | 5,2 \pm 0,08 ^{aA} |
| 30 | 5,4 \pm 0,08 ^{aB} | 4,8 \pm 0,3 ^{bA} | 5,2 \pm 0,25 ^{abB} | 4,8 \pm 0,17 ^{bA} | 5,2 \pm 0,22 ^{abA} |
| 60 | 5,5 \pm 0,06 ^{aAB} | 4,9 \pm 0,12 ^{bA} | 5,5 \pm 0,09 ^{aAB} | 4,9 \pm 0,21 ^{bA} | 5,5 \pm 0,24 ^{aA} |
| 90 | 5,5 \pm 0,15 ^{aAB} | 4,9 \pm 0,24 ^{bA} | 5,4 \pm 0,14 ^{aAB} | 4,9 \pm 0,11 ^{bA} | 5,4 \pm 0,17 ^{aA} |
| 120 | 5,7 \pm 0,12 ^{aA} | 5,1 \pm 0,11 ^{bA} | 5,6 \pm 0,11 ^{aA} | 5 \pm 0,14 ^{bA} | 5,6 \pm 0,14 ^{aA} |
| 150 | 5,7 \pm 0,07 ^{aA} | 5 \pm 0,1 ^{bA} | 5,7 \pm 0,08 ^{aA} | 5 \pm 0,06 ^{bA} | 5,6 \pm 0,09 ^{aA} |

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

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

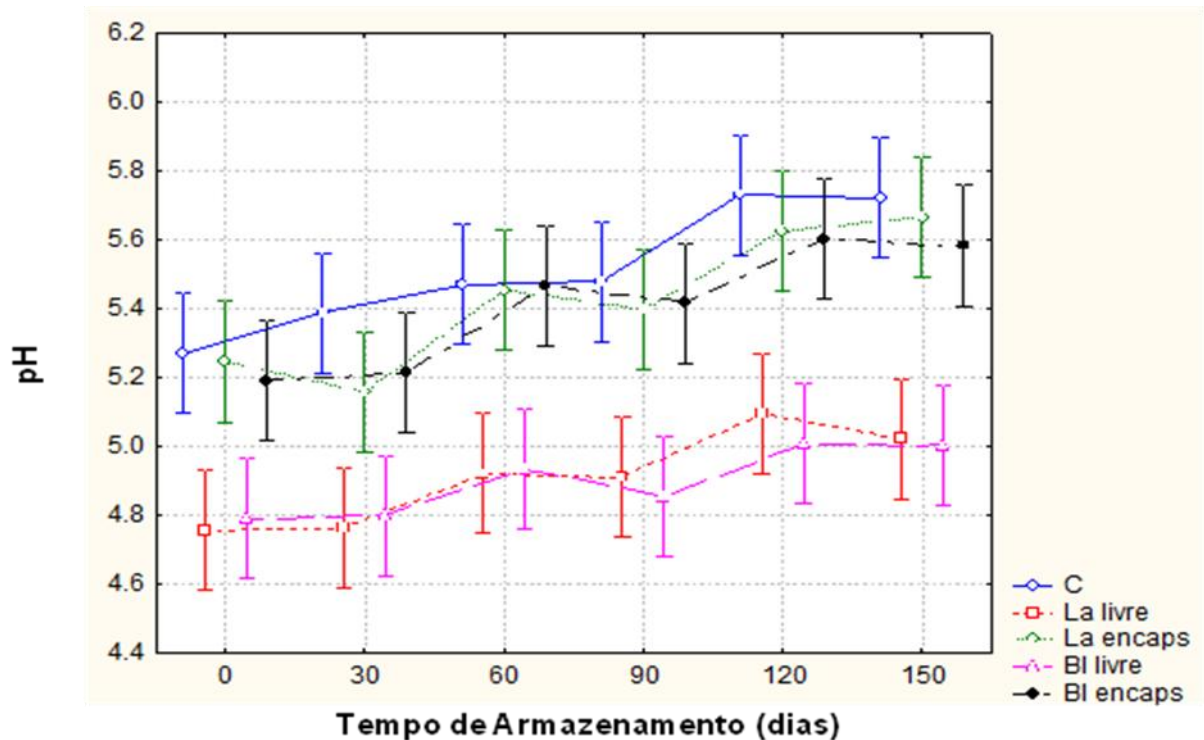
T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

A fermentação ocorreu em, aproximadamente, 24 horas com consequente queda do pH de todos os tratamentos, apresentando diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. Essas diferenças são devidas às variações do processamento, pois do ponto de vista de eficiência do processo de secagem, o ideal é paralisar o pH em torno de 5,0, próximo ao ponto isoelétrico das proteínas. Por sua vez, o tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) obteve média 4,7 e essa grande acidificação provavelmente está relacionada com o poder de acidificação do *Lactobacillus acidophilus* ou com o fato da atuação dele gerar compostos que estimulem a atividade das demais bactérias lácticas. As bactérias lácticas formam ácido láctico metabolizando os carboidratos presentes na massa cárnea, o qual irá refletir no efeito protetor contra microrganismos indesejáveis, conversão e estabilização da cor, além da formação de compostos desejáveis de sabor e aroma característicos dos embutidos fermentados (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Este valor de pH 4,7 do tratamento *Lactobacillus acidophilus* mostra-se abaixo dos valores de pH 5 e 5,2 encontrados por Sameshima et al. (1998) que estudaram a adição de *L. rhamnosus* e *L. paracasei ssp. paracasei* em salames e aos apresentados por Muthukumarasamy e Holley (2006) que obtiveram valor de pH 5,3 para *Lactobacillus reuteri* encapsulado ou não para o mesmo período, diferindo do *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) que teve uma ação menos intensa na redução do pH como constatado neste trabalho. Este resultado pode ser atribuído possivelmente ao fato do *Lactobacillus acidophilus* encapsulado ter tido sua atividade metabólica reduzida por estar aprisionado na cápsula, sem acesso aos nutrientes.

Na Tabela 11 observa-se que houve um aumento nos valores do pH pós fermentação para tempo 0 (salame maturado) com médias que variaram de 4,7 a 5,2 para 4,8 a 5,3, sendo detectada diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. Como se pode verificar ocorreu um aumento de pH entre o final da fermentação e o término da secagem, sendo que este fato também foi observado por Scheid et al. (2003). Os tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre (Figura 15). Esta diferença estatística relacionada às variações de pH observadas pode ser explicada pelo fato dos microrganismos encapsulados terem

sua atividade metabólica reduzida, por estarem aprisionados na cápsula e, portanto, sem contato com nutrientes para promoverem a fermentação. Com isso, o valor de pH dos tratamentos encapsulados é similar aos do controle.



C: controle (T1); La livre: *Lactobacillus acidophilus* livre (T2); La encaps: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3); BI livre: *Bifidobacterium lactis* livre (T4); BI encaps: *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5).

Figura 15 - Valores médios de pH nas amostras de salame tipo Italiano, por tratamento e tempo de armazenamento

Na tabela 11, verifica-se que as médias de pH dos cinco tratamentos pouco se alteraram do tempo 0 para o 30º dia, porém foi observada diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. As maiores médias encontradas foram as dos tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) com 5,4, 5,2 e 5,2, respectivamente. Resultados acima dos encontrados por Gøtterup et al. (2008), de 5,1 em salames produzidos com nitrato de sódio e *Staphylococcus carnosus* como bactéria nitrato-reutora aos 21 dias de armazenamento. O tratamento adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) obteve média 4,8 no valor de pH, o que está de acordo com Muthukumarasamy e Holley (2006) que obteve valor médio 4,7 em *Lactobacillus*

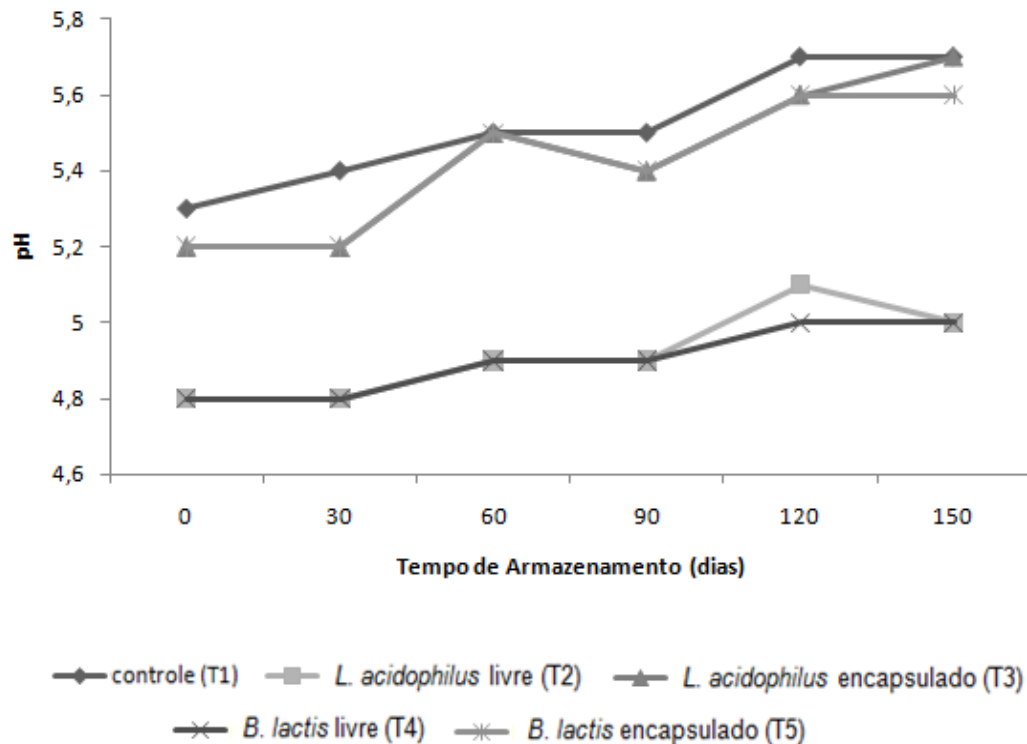
reuteri. Nesta mesma pesquisa estes mesmos autores verificaram que para o salame com *Lactobacillus reuteri* encapsulado o pH também foi 4,7, o que difere do encontrado no presente trabalho de 5,2. Esta diferença de resultados possivelmente ocorreu pelo fato da cápsula produzida por Muthukumarasamy e Holley (2006) ter liberado os probióticos no salame, ou seja, a cápsula deve ter sido rompida, o que não deve ter ocorrido no presente trabalho.

As análises do tempo 60 até 150 dias de armazenamento mostraram que houve um ligeiro aumento nos valores médios de pH e os tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos tratamentos *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) e *Bifidobacterium lactis* livre (T4). Este aumento de pH não constitui um risco à segurança do produto, porque, ao mesmo tempo a atividade de água foi reduzida a níveis que desestimulam a multiplicação bacteriana. Aumento semelhante foi observado por Lee et al. (2009) em salames armazenados por 120 dias a temperatura ambiente de 25°C.

Os altos valores de pH encontrados para os tratamentos com microencapsulação, quando comparados aos tratamentos na forma livre, devem-se, provavelmente, à proteção gerada pelas cápsulas aos probióticos, o que os impediu de interagir com o meio, reduzindo a acidificação. Por sua vez, os tratamentos T2 e T4 (livres) apresentaram o pH próximo ao ponto isoelétrico das proteínas, devido à alta concentração de substratos existentes na formulação, que reduziram o pH até a finalização destes no meio.

Os valores finais de pH variaram entre 5 e 5,7 para os salames tipo Italiano do presente estudo, coerentes aos valores entre 5,5 a 5,9 encontrados em estudo com salames tipo Italiano (DETONI, 1994, citado por CAVENAGHI, 2005) e aos relatados por Korel e Acton (2002) que encontraram valor médio de 5,5. Portanto, os valores encontrados para os salames deste trabalho encontram-se dentro da faixa encontrada por outros autores indicando certa uniformidade na elaboração desse produto.

Avaliando os resultados da vida útil ao longo dos 150 dias, os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), *Bifidobacterium lactis* livre (T4) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) durante o período de armazenamento, ou seja, o pH desses tratamentos foi estável na vida útil do salame (Figura 16).



C: controle (T1); La livre: *Lactobacillus acidophilus* livre (T2); La encaps: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3); Bl livre: *Bifidobacterium lactis* livre (T4); Bl encaps: *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5).

Figura 16 - Valores médios de pH nas amostras de salame tipo Italiano, durante a vida útil

A verificação do pH dos produtos cárneos é utilizada como um dos critérios de sua qualidade. Nesse sentido, valores de pH inferiores a 6,2 tornam os produtos cárneos mais protegidos contra a ação de microrganismos indesejáveis. Assim como no presente estudo, em que a adição de culturas probióticas apresentou resultados satisfatórios com valores finais (150 dias) de pH variando entre 5 e 5,7, estes resultados estão de acordo com Ambrosiadis et al. (2004) que destacam que o pH de salames tradicionais varia entre 4,6 e 6,1.

4.2.3 Determinação da Oxidação Lipídica

Conforme os resultados da análise de variância da massa observa-se que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as médias dos cinco tratamentos (Tabela 12), que variaram de 1,3 a 2,2. Os maiores valores de TBARS de 2,2 mg de MDA/kg, foram dos tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T2) e

Bifidobacterium lactis (T4) ambos na forma livre. Esta aceleração na oxidação lipídica provavelmente foi induzida pelos metabólitos produzidos pelos microrganismos probióticos, por sua vez, quando estes microrganismos são encapsulados, ficam impedidos de interagir com o meio, o que reduz sua atividade metabólica, e, se há geração de metabólitos, estes possivelmente ficam aprisionados nas micropartículas.

Nas médias obtidas do tempo 0 (salame maturado) observa-se uma redução na oxidação lipídica em relação à massa, indicando que o eritorbato monossódico adicionado à formulação exerceu ação antioxidante sobre a rancificação dos lipídeos, porém não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ($p>0,05$). Os tratamentos T2 e T4 mantiveram-se com as maiores médias atingindo concentrações de 0,6 mg de MDA/kg e 0,8 mg de MDA/kg, respectivamente, por sua vez, estes valores mostraram-se acima do valor encontrado por Zanardi et al. (2002) de 0,33 mg de MDA/kg para o mesmo período.

Tabela 12 – Média (\pm desvios padrões) de TBARS (mg de malonaldeído/kg) nas amostras de salame tipo Italiano, segundo tratamento e tempo de armazenamento

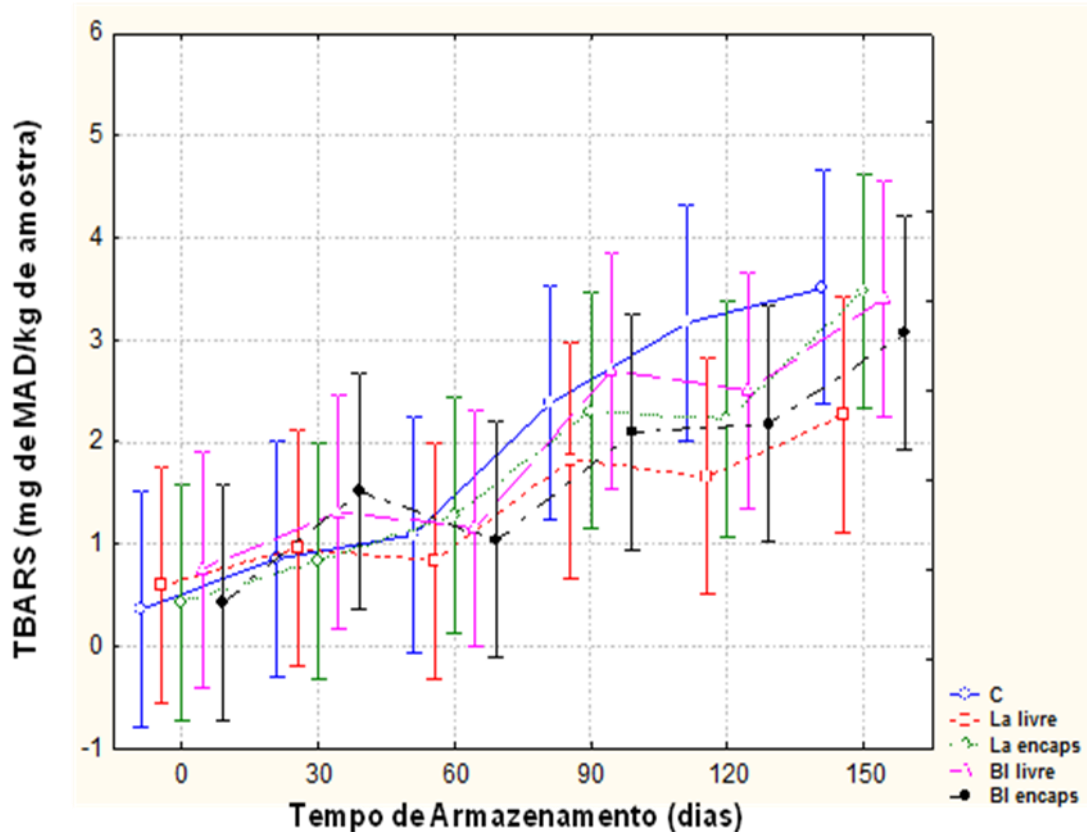
| Tempo de Armazenamento (dias) | Tratamentos | | | | |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| massa | 1,3 \pm 0,56 ^a | 2,2 \pm 0,85 ^a | 1,5 \pm 0,67 ^a | 2,2 \pm 0,98 ^a | 1,6 \pm 0,85 ^a |
| 0 | 0,4 \pm 0,35 ^{aA} | 0,6 \pm 0,31 ^{aA} | 0,4 \pm 0,29 ^{ab} | 0,8 \pm 0,27 ^{aA} | 0,4 \pm 0,41 ^{aA} |
| 30 | 0,9 \pm 0,06 ^{bA} | 1 \pm 0,05 ^{abA} | 0,8 \pm 0,29 ^{bB} | 1,3 \pm 0,31 ^{abA} | 1,5 \pm 0,32 ^{aA} |
| 60 | 1,1 \pm 0,71 ^{aA} | 0,8 \pm 0,46 ^{aA} | 1,3 \pm 0,6 ^{aAB} | 1,2 \pm 0,25 ^{aA} | 1 \pm 0,13 ^{aA} |
| 90 | 2,4 \pm 1,75 ^{aA} | 1,8 \pm 0,89 ^{aA} | 2,3 \pm 1,07 ^{aAB} | 2,7 \pm 1,11 ^{aA} | 2,1 \pm 0,98 ^{aA} |
| 120 | 3,2 \pm 1,15 ^{aA} | 1,7 \pm 0,42 ^{aA} | 2,2 \pm 0,64 ^{aAB} | 2,5 \pm 0,59 ^{aA} | 2,2 \pm 0,53 ^{aA} |
| 150 | 3,5 \pm 2,06 ^{aA} | 2,3 \pm 1,14 ^{aA} | 3,5 \pm 1,86 ^{aA} | 3,4 \pm 1,97 ^{aA} | 3,1 \pm 2,31 ^{aA} |

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

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

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

Aos 30 dias de armazenamento, observou-se diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), sendo que o *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) obteve a maior média (1,5 mg de MDA/kg) diferindo estatisticamente dos tratamentos controle (T1) e *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) (Figura 17). Este aumento de TBARS durante o armazenamento, deve-se provavelmente à ação das enzimas lipolíticas que liberam ácidos graxos insaturados livres, principalmente o ácido linoléico, oléico e araquidônico, altamente susceptíveis à oxidação nos produtos cárneos e que são influenciadas por diversos fatores relacionados ao processo de fabricação, como a quantidade e o tipo de gordura empregados (as microcápsulas foram revestidas por gordura de palma interesterificada), o teor de sal e de condimentos, o grau de moagem da carne, a temperatura de maturação, o pH e o potencial redox durante o processamento, conforme justificativas apresentadas nos resultados obtidos por Cichoski (2004) e Pinto, Ponsano e Heinemann (2001). As médias obtidas entre 0,8 a 1,5 mg de MAD/kg para este período, estão abaixo das relatadas por Macedo (2005) entre 1,74 e 2,75 mg de MAD/kg em experimento realizado com *Lactobacillus paracasei* no 28º dia.



C: controle (T1); La livre: *Lactobacillus acidophilus* livre (T2); La encaps: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3); BI livre: *Bifidobacterium lactis* livre (T4); BI encaps: *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5).

Figura 17 - Valores médios de oxidação lipídica nas amostras de salame tipo Italiano, por tratamento e tempo de armazenamento

Os valores de TBARS encontrados na literatura, para salames, são muito variáveis. Lorenzo et al. (2000), avaliando as características bioquímicas de salames tradicionais da Espanha, encontrou valores entre 0,15 a 2,96 mg de MAD/kg para o salame denominado de “Botillo” e de 0,27 a 15,4 mg de MAD/kg para o salame denominado de “Androlla”.

As concentrações de TBARS dos tratamentos controle (T1) e *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) aumentaram gradualmente até o tempo de 60 dias de armazenamento, com valores médios de 1,1 a 1,3 mg de MAD/kg, respectivamente, entretanto não foi observada diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Estes valores estão acima dos encontrados por Zanardi et al. (2002) de 1,05 mg MDA/kg em salame tipo Milano, para o mesmo período. Apesar deste aumento observado para o *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3), os resultados da análise sensorial para este mesmo período indicam que este

tratamento foi o mais aceito pelos consumidores com 64,7% (discutido posteriormente no item 4.3), uma vez que esta variação nas concentrações de TBARS não são percebidas sensorialmente.

Conforme os resultados aos 90 dias de armazenamento, constatou-se que houve um aumento significativo no número de TBARS para todos os tratamentos. O tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4) apresentou a maior média de 2,7 mg de MAD/kg, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Comportamento similar foi encontrado por Wang, Jlang e Lin (1995) para salames tipo Chinês que aumentaram suas concentrações durante o tempo de armazenamento de valores ao redor de 0,6 mg de MAD/kg para valores entre 2,8 mg de MAD/kg. Estes aumentos provavelmente são decorrentes de diversos fatores como possível residual de oxigênio remanescente na embalagem após o fechamento a vácuo e a taxa de permeabilidade ao oxigênio característica da embalagem. Bote et al. (2005), sugerem que a evolução da oxidação lipídica em carne e produtos cárneos suínos sofre muitas variações, podendo algumas vezes alcançar valores de 1,5 a 2 mg de MAD/kg em poucos dias, e, algumas vezes, a oxidação pode ocorrer tão lentamente que não chega a ser considerada um problema.

Avaliando os resultados aos 120 e 150 dias de armazenamento, verifica-se que novamente não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. As médias obtidas para os salames aos 120 dias variaram de 1,7 a 3,2 mg de MAD/kg e aos 150 dias de 2,3 a 3,5 mg de MAD/kg. De acordo com Summo, Caponio e Pasqualone (2006) a baixa atividade de água e o elevado teor de gordura dos produtos cárneos fermentados, fazem com que a oxidação lipídica seja uma das principais causas da diminuição da qualidade durante a vida útil dos produtos. Resultados semelhantes aos encontrados por Novelli et al. (1997) em amostras comerciais de salame tipo Milano, que apresentaram valores de TBARS variando de 0,4 a 3,9 mg de MAD/kg e por Macedo (2005) em amostras de salame com *Lactobacillus paracasei* cujo valor encontrado foi 3,3 mg de MAD/kg, aos 133 dias de armazenamento.

Considerando as concentrações 1,7, 2,2 e 2,5 mg de MAD/kg no 120º dia de armazenamento, obtidas para os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* livre (T4), respectivamente, nota-se uma ligeira redução dessas concentrações quando

comparadas ao tempo 90 dias. Esta diminuição dos valores de TBARS pode ser atribuída às reações de malonaldeído com proteínas durante o período de armazenamento, apesar de o malonaldeído ser um produto secundário da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (Melton, 1993 citado por Marangoni, 2007).

Cichoski (2004) obteve valores de TBARS variando entre 0,03 e 1,04 mg de MAD/kg em paleta suína fermentada após 120 dias de armazenamento. Este mesmo autor relata que valores de TBARS inferiores a 1,59 mg de MAD/kg são considerados baixos para serem percebidos sensorialmente e não causam alarme para a saúde humana. Segundo Zanardi et al. (2004) o excesso de oxidação pode atingir um nível de rancidez, no qual o alimento não é mais aceito. Esta afirmação e a constatação das elevadas concentrações de todos os tratamentos aos 90 dias de armazenamento fizeram com que a vida útil fosse definida como de 90 dias e análise sensorial fosse realizada somente até este período, sendo perceptível pelos provadores a rancidez das amostras no atributo sabor da análise sensorial (discutido posteriormente no item 4.3).

Os valores de TBARS durante a vida útil dos salames estão apresentados na Figura 18, sendo o tempo zero o produto acabado e os demais a cada trinta dias. Observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para o tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) durante o período de armazenamento. As amostras do controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3), *Bifidobacterium lactis* livre (T4) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) obtiveram médias finais de 3,5, 2,3, 3,5, 3,4 e 3,1, respectivamente, porém não sendo observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos estudados, ou seja, a oxidação lipídica aumentou ao longo do armazenamento, independente da forma que as culturas probióticas foram adicionadas, se livres ou encapsuladas.

Com isso, nem mesmo os salames do tratamento controle diferenciaram-se daqueles com probióticos, indicando que a adição de probióticos não influenciou na oxidação, o que pode ser considerado um resultado muito positivo.

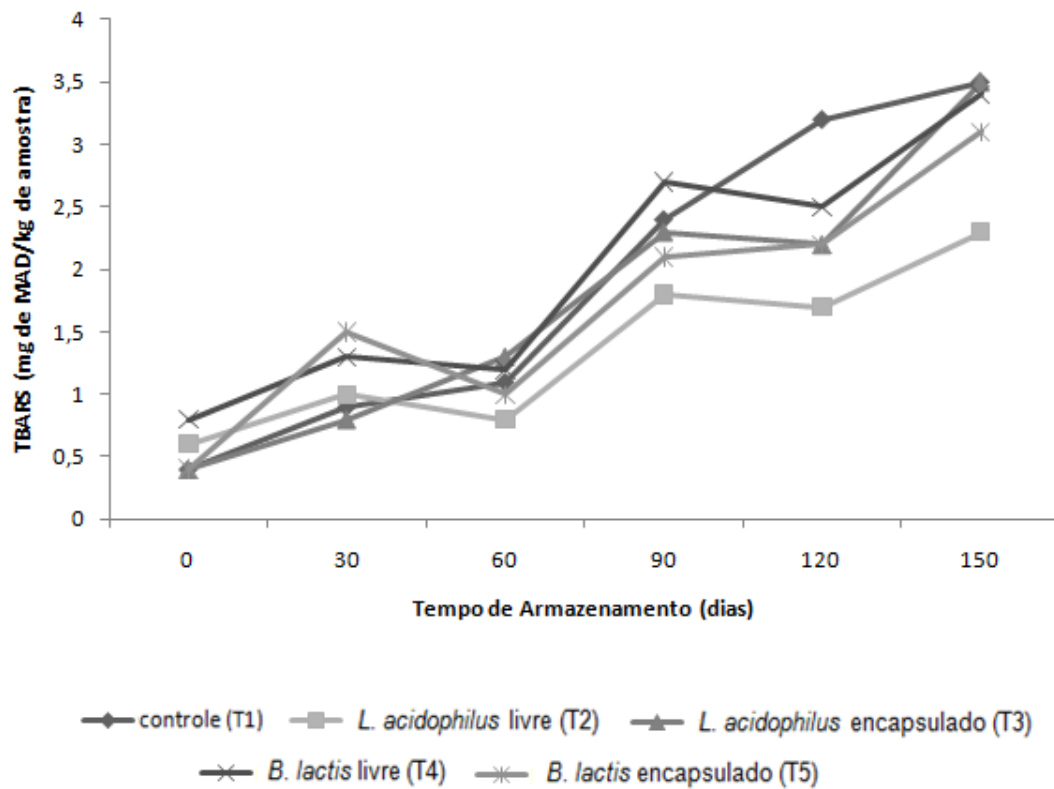


Figura 18 – Valores médios da oxidação lipídica nas amostras de salame tipo Italiano, durante a vida útil

4.2.4 Determinação da Atividade de Água (A_w)

Considerando os resultados obtidos na análise de variância para a determinação da atividade de água da massa, constatou-se que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos com culturas probióticas e o controle, com médias que variaram de 0,96 a 0,97 (Tabela 13).

Tabela 13 – Média (\pm desvios padrões) de Atividade de Água (Aw) nas amostras de salame tipo Italiano, segundo tratamento e tempo de armazenamento

| Tempo de Armazenamento (dias) | Tratamentos | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| massa | 0,97 \pm 0,003 ^a | 0,97 \pm 0,001 ^a | 0,97 \pm 0,001 ^a | 0,96 \pm 0,006 ^a | 0,96 \pm 0,007 ^a |
| 0 | 0,87 \pm 0,018 ^{abA} | 0,84 \pm 0,007 ^{bcA} | 0,86 \pm 0,006 ^{abcA} | 0,83 \pm 0,019 ^{CA} | 0,88 \pm 0,015 ^{aA} |
| 30 | 0,86 \pm 0,007 ^{aA} | 0,84 \pm 0,018 ^{abA} | 0,86 \pm 0,009 ^{aA} | 0,83 \pm 0,008 ^{bA} | 0,86 \pm 0,008 ^{aAB} |
| 60 | 0,86 \pm 0,02 ^{aA} | 0,84 \pm 0,022 ^{aA} | 0,86 \pm 0,012 ^{aA} | 0,83 \pm 0,01 ^{aA} | 0,86 \pm 0,009 ^{aAB} |
| 90 | 0,87 \pm 0,018 ^{aA} | 0,84 \pm 0,027 ^{aA} | 0,85 \pm 0,004 ^{aA} | 0,83 \pm 0,007 ^{aA} | 0,86 \pm 0,015 ^{aAB} |
| 120 | 0,85 \pm 0,019 ^{abA} | 0,83 \pm 0,024 ^{abA} | 0,85 \pm 0,005 ^{aA} | 0,82 \pm 0,004 ^{bA} | 0,84 \pm 0,007 ^{abb} |
| 150 | 0,85 \pm 0,015 ^{aA} | 0,83 \pm 0,022 ^{aA} | 0,85 \pm 0,006 ^{aA} | 0,82 \pm 0,005 ^{aA} | 0,85 \pm 0,016 ^{aAB} |

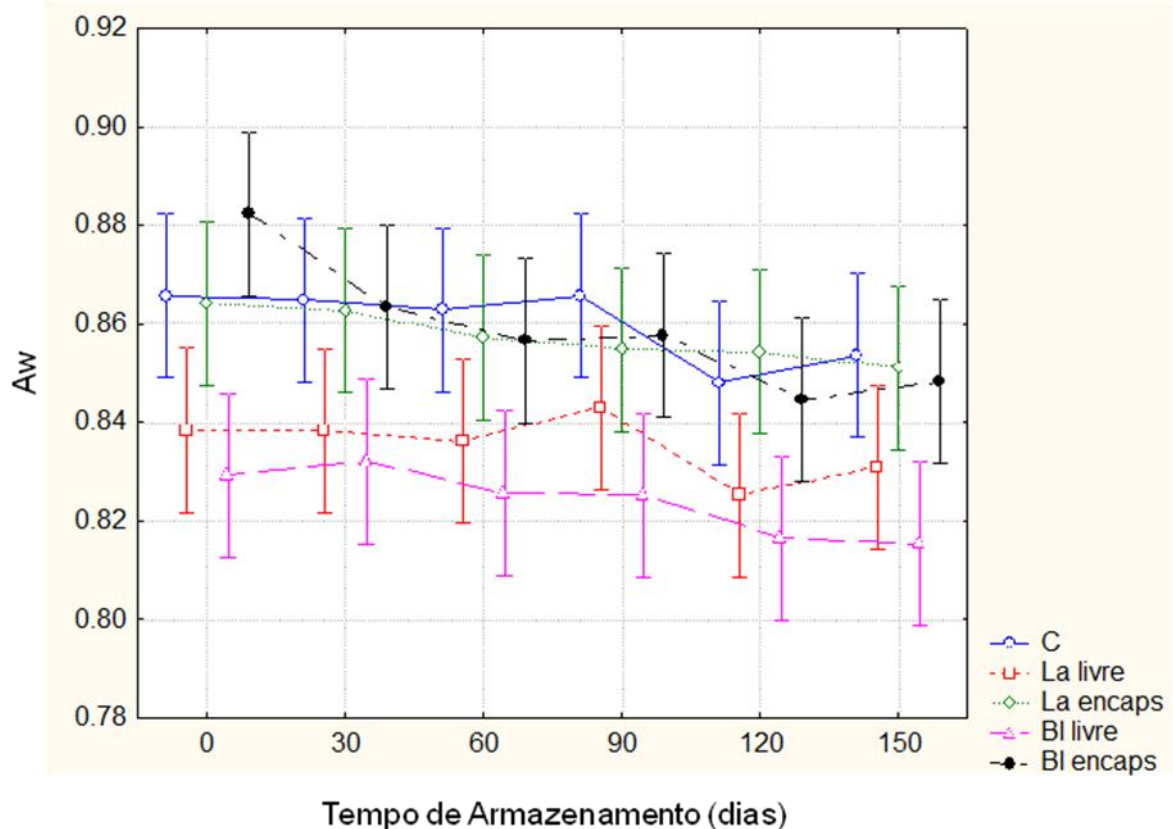
Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

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

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

No tempo 0 (salame maturado) foi detectada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. As amostras de *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4), ambos na forma livre. A redução observada nas médias da massa de 0,96 a 0,97 para 0,83 a 0,88 do tempo 0 é desejável, sendo decorrente do processo de secagem, onde a água essencial para a multiplicação de microrganismos é retirada da massa do salame. Segundo, Kottke et al. (1996) os microrganismos somente usam uma parte da água total remanescente (água livre) para sua multiplicação e metabolismo, sendo que as bactérias responsáveis por deteriorações multiplicam-se somente em atividade de água superior a 0,90. Sanchez-Rodriguez (2001) também afirma que o conteúdo de água é o primeiro fator que influencia o parâmetro de luminosidade (L^*), uma vez que a perda de umidade reduz a quantidade de luz refletida, justificando o menor valor de L^* para estes mesmos tratamentos T2 e T4 (discutido anteriormente no item 4.2.1).

Conforme as médias do tempo 30 (Figura 19), os maiores valores de atividade de água encontrados foram dos tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) com 0,86 para estes três tratamentos, diferenciando-se significativamente ($p < 0,05$) do T2 e T4. Estes parâmetros estão coerentes com os encontrados na determinação do pH, onde estes tratamentos apresentaram os maiores valores. Conseqüentemente, nas análises de determinação da acidez e de perda de peso, foram observadas, para estes mesmos tratamentos, os menores índices de acidez e as menores perdas (discutido posteriormente nos itens 4.2.5 e 4.2.6). A média 0,86 do tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) está coerente com o relatado por Muthukumarasamy e Holley (2006), que obtiveram o valor de 0,88 para amostras de salame com *Lactobacillus reuteri* encapsulado ou não.



C: controle (T1); La livre: *Lactobacillus acidophilus* livre (T2); La encaps: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3); BI livre: *Bifidobacterium lactis* livre (T4); BI encaps: *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5).

Figura 19 - Valores médios de atividade de água (A_w) nas amostras de salame tipo Italiano, por tratamento e tempo de armazenamento

De acordo com as avaliações nos tempos de armazenamento 60 e 90 dias, constatou-se que os valores dos tratamentos pouco se alteraram e que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Este fato deve-se provavelmente ao equilíbrio do meio encontrado pelas amostras. Entretanto, na análise de variância das médias do 120º dia verificou-se que o tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) diferenciou-se significativamente ($p < 0,05$) do tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4), coincidindo com os resultados encontrados nos parâmetros de pH, acidez e perda de peso para o mesmo período. Segundo Mauriello et al. (2004) quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas ocorre uma diminuição na capacidade de retenção de água, facilitando à desidratação e conseqüentemente a redução na A_w dos salames. Assim sendo, de acordo com as condições ambientais de armazenamento do produto e da permeabilidade ao vapor d'água da embalagem, o produto tende a entrar em equilíbrio, perdendo ou ganhando água (ANSELMO; MATA; RODRIGUES, 2008).

Avaliando os valores no tempo 150 dias de armazenamento, observou-se que não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e que os valores decresceram no decorrer do período independente da forma como as culturas probióticas foram adicionadas, se livres ou encapsuladas. De acordo com Työppönen et al. (2003) a atividade de água constitui o mais importante fator para a multiplicação microbiana e por isso sua diminuição torna-se o obstáculo de maior efeito sobre a multiplicação de microrganismos indesejáveis no salame.

Os valores finais obtidos foram de 0,85, 0,83, 0,85, 0,82 e 0,85 para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente, abaixo dos observados por Garcia, Gagleazzi e Sobral (2000) de 0,87 a 0,88 e coerentes com Herrero et al. (2007), que observaram valores entre 0,83 e 0,89.

Durante a vida útil dos salames observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nos valores de atividade de água para o tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) (Figura 20). Mesmo havendo diferenças estatísticas entre os valores de atividade de água para os diferentes períodos da vida útil e entre os tratamentos, estas variações podem ser devidas às variações inerentes às amostras durante o período de secagem, como por exemplo, aquelas causadas pela posição da amostra no interior da câmara de secagem.

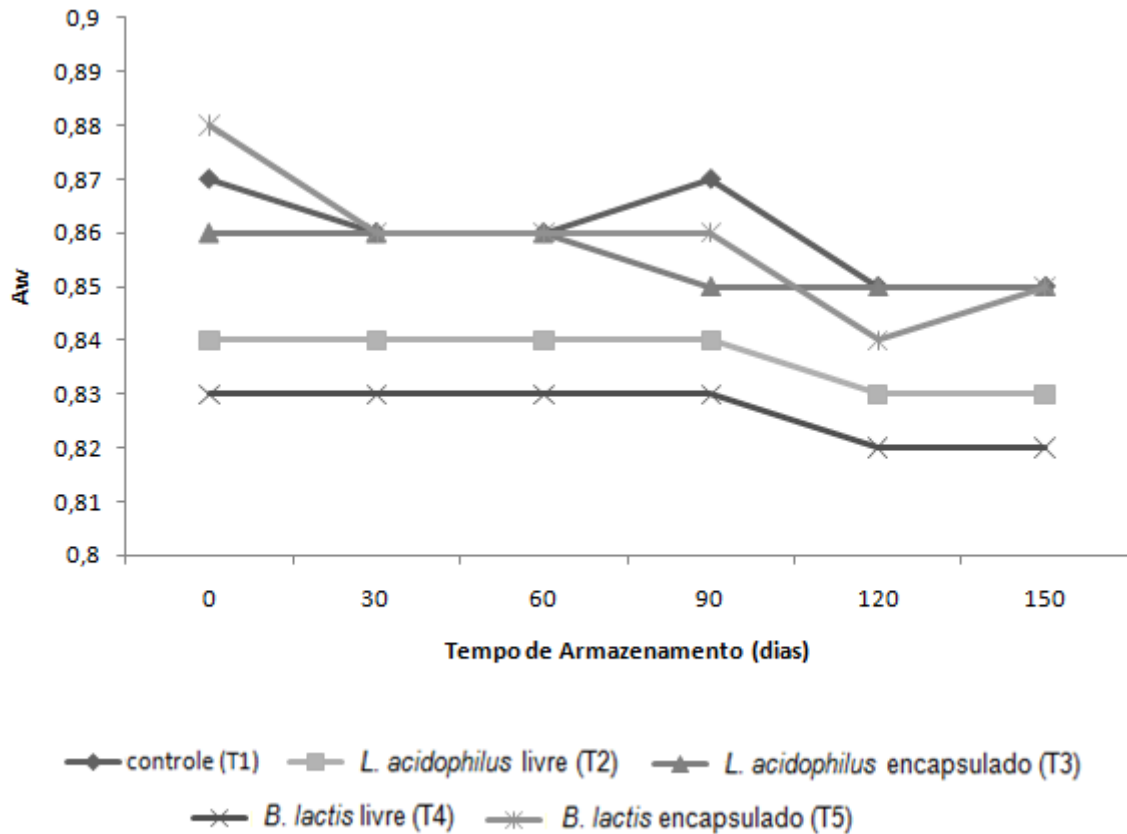


Figura 20 – Valores médios de atividade de água (A_w) nas amostras de salame tipo Italiano, durante a vida útil

A atividade de água e a embalagem a vácuo são os últimos obstáculos do processamento de salame para se alcançar a segurança e a estabilidade à temperatura ambiente. O parâmetro de atividade de água estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame tipo Italiano é de no máximo 0,90 (BRASIL, 2000), mas a indústria brasileira utiliza valores em torno de 0,87, como verificados por Cavenaghi (2005) em trabalhos realizados sobre as marcas comerciais.

4.2.5 Determinação da Acidez em Ácido Láctico

Conforme os resultados da análise de variância da determinação da acidez na massa constatou-se que não houve diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre tratamentos, com médias que variaram de 0,06 a 0,08 (Tabela 14).

No tempo 0 (salame maturado), o tratamento *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$)

dos tratamentos T1, T3 e T5 e apresentaram valores médios de 0,26. A evolução da acidez titulável se deu inversamente proporcional ao desenvolvimento do pH durante todo o período estudado o que favorece a confirmação dos resultados, indicando coerência entre os parâmetros analisados.

Tabela 14 – Média (\pm desvios padrões) de acidez (g de ácido láctico/100g) nas amostras de salame tipo Italiano, segundo tratamento e tempo de armazenamento

| Tempo de Armazenamento (dias) | Tratamentos | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| massa | 0,07 \pm 0,021 ^a | 0,08 \pm 0,027 ^a | 0,06 \pm 0,014 ^a | 0,08 \pm 0,023 ^a | 0,07 \pm 0,022 ^a |
| 0 | 0,17 \pm 0,003 ^{bb} | 0,26 \pm 0,007 ^{abC} | 0,17 \pm 0,005 ^{ba} | 0,26 \pm 0,022 ^{aAB} | 0,17 \pm 0,009 ^{bA} |
| 30 | 0,17 \pm 0,036 ^{ab} | 0,2 \pm 0,03 ^{ac} | 0,16 \pm 0,05 ^{aa} | 0,22 \pm 0,073 ^{ab} | 0,17 \pm 0,049 ^{aa} |
| 60 | 0,2 \pm 0,035 ^{aAB} | 0,31 \pm 0,057 ^{aAB} | 0,21 \pm 0,034 ^{aa} | 0,3 \pm 0,062 ^{aAB} | 0,2 \pm 0,034 ^{aa} |
| 90 | 0,24 \pm 0,026 ^{ba} | 0,33 \pm 0,023 ^{aAB} | 0,22 \pm 0,012 ^{ba} | 0,37 \pm 0,031 ^{aa} | 0,23 \pm 0,009 ^{ba} |
| 120 | 0,23 \pm 0,016 ^{baB} | 0,33 \pm 0,02 ^{aAB} | 0,22 \pm 0,012 ^{ba} | 0,35 \pm 0,012 ^{aa} | 0,23 \pm 0,045 ^{ba} |
| 150 | 0,23 \pm 0,008 ^{baB} | 0,35 \pm 0,017 ^{aa} | 0,22 \pm 0,021 ^{ba} | 0,35 \pm 0,008 ^{aa} | 0,24 \pm 0,025 ^{ba} |

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

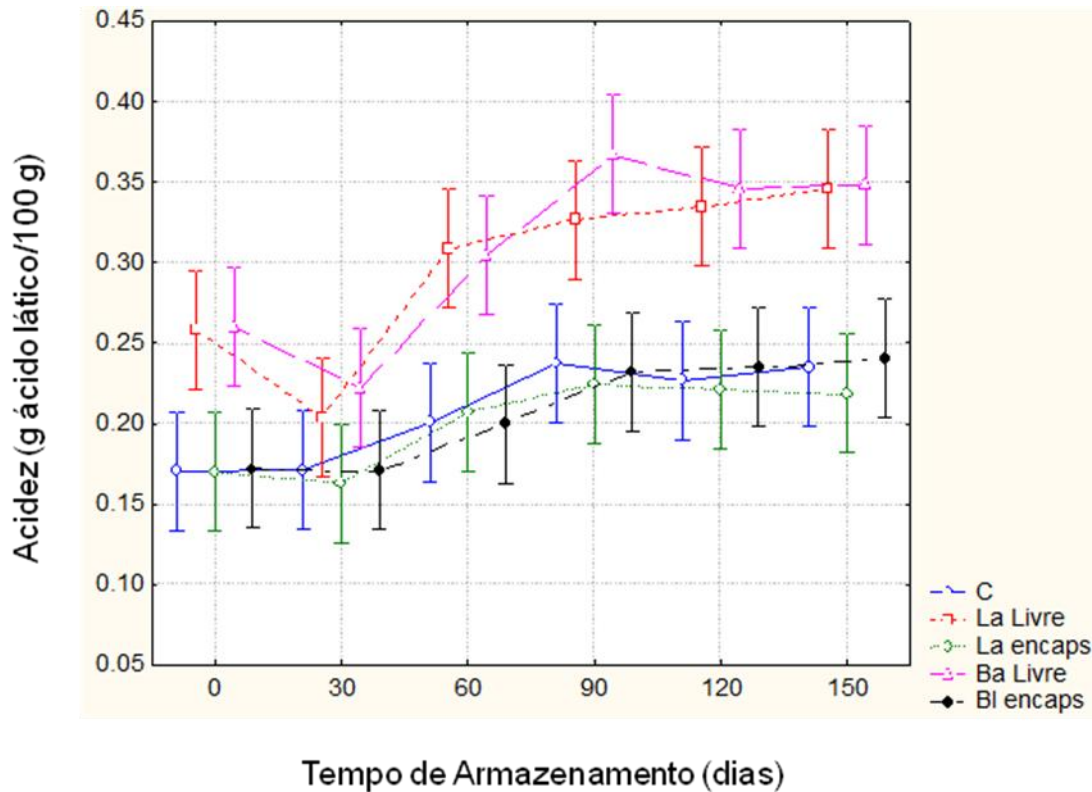
Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

Nas análises realizadas nos tempos de 30 e 60 dias de armazenamento, constatou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 21). Observa-se também que os valores médios para os tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* (T3) e *Bifidobacterium lactis* (T5) ambos encapsulados, foram similares, apresentando menores valores de acidez, enquanto que os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre, apresentaram as maiores médias. As médias observadas de acidez dos salames são coerentes com a queda do pH e da atividade de água discutidas anteriormente.

Com relação aos resultados da análise para o tempo 90 dias de

armazenamento, os salames do tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) e *Bifidobacterium lactis* livre (T4) apresentaram as maiores médias 0,33 e 0,37, respectivamente, constatando-se que houve diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos T1, T3 e T5 e confirmando-se o fato de que os microrganismos probióticos adicionados na forma livre apresentaram forte atividade fermentativa e/ou estimularam essa atividade nas demais culturas lácticas presentes. Entretanto, para os tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* (T3) e *Bifidobacterium lactis* (T5) ambos encapsulados, foram novamente observadas as menores médias 0,24, 0,22 e 0,23, respectivamente. Resultado que confirma que os microrganismos probióticos encapsulados não foram capazes de interagir com o meio, o que reduziu sua capacidade fermentativa e/ou de estimular as demais culturas presentes. Para este período, foi verificado um acréscimo nos valores de TBARS de 54% para o T1, 44% para o T3 e 53% para o T5. Estas menores médias de acidez devem-se, provavelmente, ao aumento de TBARS, uma vez que os ácidos graxos livres produzidos a partir da ação das enzimas lipolíticas são susceptíveis à oxidação e um dos fatores que as influenciam é o pH.



C: controle (T1); La livre: *Lactobacillus acidophilus* livre (T2); La encaps: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3); BI livre: *Bifidobacterium lactis* livre (T4); BI encaps: *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5).

Figura 21 - Valores médios de acidez (g ácido láctico/100g) nas amostras de salame tipo Italiano, por tratamento e tempo de armazenamento

Nas análises de variância dos tempo 120 e 150 dias de armazenamento os mesmos tratamentos *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) e *Bifidobacterium lactis* livre (T4) diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos tratamentos T1, T3 e T5, com valores finais de acidez láctica de 0,23, 0,35, 0,22, 0,35 e 0,24 para os tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5, respectivamente. Entretanto, os valores deste trabalho são inferiores aos encontrados por Korel e Acton (2002), que apresentaram valor médio de acidez láctica de 1,9% para salame tipo Italiano .

Durante a vida útil dos salames observou-se que os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T3) e *Bifidobacterium lactis* (T5), ambos encapsulados diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) dos tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) e *Bifidobacterium lactis* livre (T4), quanto aos valores de acidez (Figura 22). Independente do tratamento aplicado, observou-se uma elevação nos valores ao longo dos 150 dias de armazenamento para todos os tratamentos quando comparados ao início do processamento, sendo mais evidente nos tratamentos com adição de probióticos na forma livre.

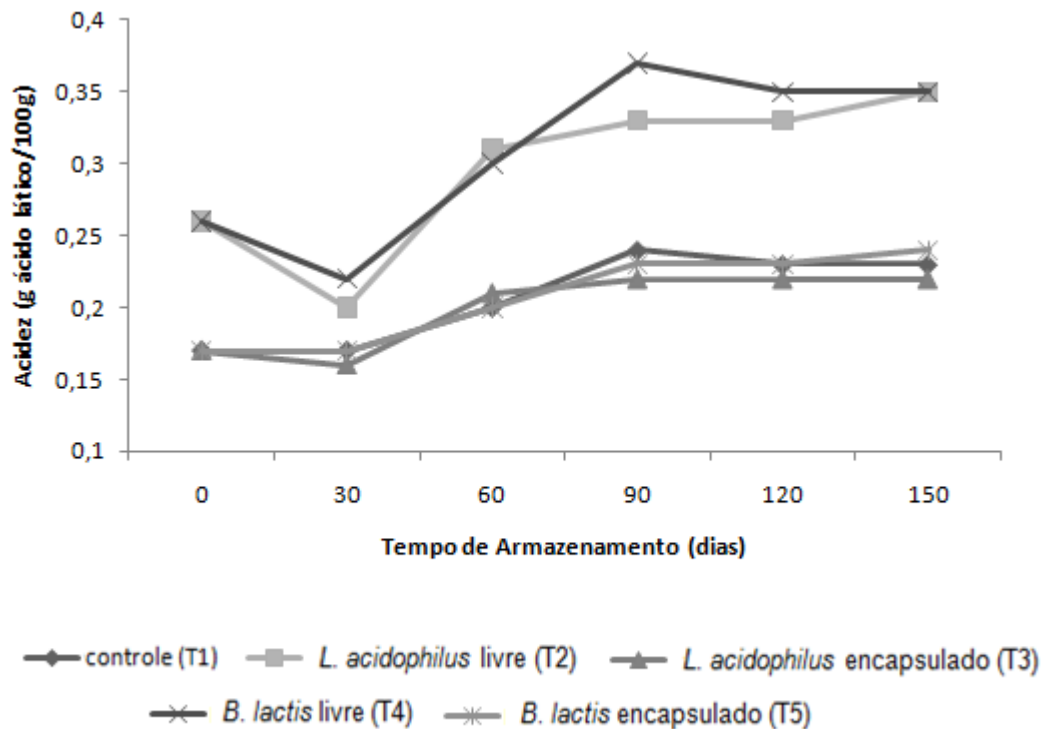


Figura 22 - Valores médios de acidez (g de ácido láctico/100g) nas amostras de salame tipo Italiano, durante a vida útil

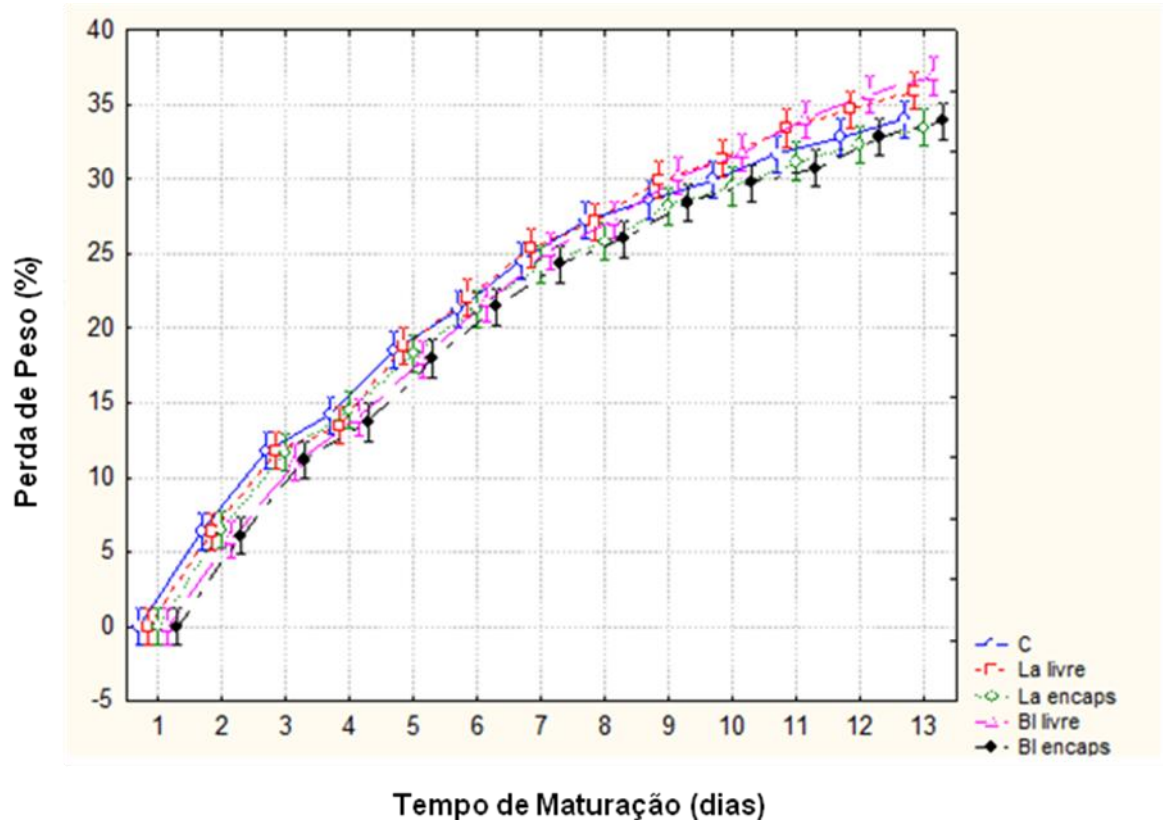
Quando se relaciona os valores de acidez com os índices de TBARS, verifica-se que estes parâmetros são inversamente proporcionais. Conforme a acidez observada para o tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) constata-se que este tratamento obteve o menor índice de TBARS para o mesmo período, justamente pela maior concentração de ácidos graxos livres oxidados. A quantidade de ácidos graxos livres pode reduzir com o tempo devido à alta susceptibilidade desses compostos à oxidação, havendo a formação de um grande número de substâncias voláteis e precursores do aroma (CICHOSKI; TERRA, 2001).

Segundo Kenneally et al. (1998), a quantidade de ácidos graxos livres em embutidos cárneos fermentados aumenta significativamente no 50º dia de armazenamento, sendo que no presente trabalho este aumento foi observado até o 90º dia, se mantendo constante até o 150º dia.

4.2.6 Avaliação da Perda de Peso

Na análise da variância dos dados de perda de peso, houve efeito significativo de tratamento ($p \leq 0,05$) e tempo de maturação ($p \leq 0,05$), porém não houve efeito de interação do tratamento x tempo de maturação ($p > 0,05$).

A Figura 23 mostra a perda de peso dos salames durante os 13 dias de fermentação e secagem. Nesta figura, se observa claramente o comportamento exponencial das curvas da perda de peso, onde os tratamentos com adição das culturas probióticas na forma livre (T2 e T4) apresentaram maior taxa de perda de peso (36,9% para *Lactobacillus acidophilus* e 35,9% para *Bifidobacterium lactis*) no período de secagem em relação às culturas probióticas na forma encapsulada T3 e T5 (33,5% para *Lactobacillus acidophilus* e 33,9% para *Bifidobacterium lactis*). As culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* (T3) e *Bifidobacterium lactis* (T5) ambas na forma encapsulada apresentaram perdas de peso similares ao controle (T1). Estes valores obtidos estão dentro dos parâmetros 30 a 40% considerados ideais, relatados por Rust (1994) e abaixo dos 44% encontrados por Garcia; Gagleazzi e Sobral (2000) no processamento de salame tipo Italiano. O tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) apresentou valor acima dos relatados por Macedo et al. (2008) de 29 a 34% em embutidos com *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*.



C: controle (T1); La livre: *Lactobacillus acidophilus* livre (T2); La encaps: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3); BI livre: *Bifidobacterium lactis* livre (T4); BI encaps: *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5).

Figura 23 - Perda de Peso (%) das amostras de salame tipo Italiano durante os 13 dias de secagem

Após esse período de fermentação e secagem, os salames foram armazenados em embalagem a vácuo, não permitindo trocas gasosas com o exterior e por isso a perda de peso não foi determinada durante o armazenamento.

Relacionando a perda de peso com a atividade de água verificou-se que os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre, mostraram as menores perdas de peso e conseqüentemente os menores valores de atividade de água. Esta condição está relacionada ao menor valor de pH encontrado, que ocasionou uma maior perda de água durante o processamento, proporcionando valores de atividade de água (A_w) mais baixos e de acidez mais altos para estes tratamentos, haja vista que o pH é um dos principais fatores que influenciam na difusão da água do interior para a superfície do embutido (PINTO; PONSANO; HEINEMANN, 2001).

A diminuição da quantidade de água dos salames, durante o período de maturação, é um dos principais fatores responsáveis pela textura do produto final

(FERNÁNDEZ et al., 2000). Nesse período também ocorre o desenvolvimento do *flavour* dos salames, por uma série de reações químicas e bioquímicas envolvendo as proteínas, as gorduras e os carboidratos (MONTEL; MASSON; TALON, 1998). Além de contribuir com a textura, a redução da A_w dos salames se constitui em uma barreira ao desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas, assim sendo, aumenta a estabilidade e, conseqüentemente, a segurança dos alimentos (HUGAS; MONFORT, 1997).

Através do exposto, verifica-se que a adição de culturas probióticas na forma livre afetou diretamente o processo de secagem do salame tipo Italiano, uma vez que a incorporação de culturas probióticas na forma encapsulada apresentou as menores perdas de peso, semelhantes ao controle.

4.2.7 Contagem dos Probióticos

As culturas probióticas apresentaram capacidade de multiplicação e, portanto, viabilidade em um produto cárneo fermentado, com aumento do número de células viáveis nos primeiros dias de fermentação como pode ser visto na Tabela 15. No início do processamento, a contagem inicial de células viáveis observadas para *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre, foi de 9×10^8 e 1×10^8 UFC/g, respectivamente, enquanto para *Lactobacillus acidophilus* (T3) e *Bifidobacterium lactis* (T5) ambos encapsulados, foi de 5×10^7 e 4×10^7 UFC/g, respectivamente. Estas contagens são similares às relatadas por Pidcock, Heard e Henriksson (2002), que obtiveram valores entre $1,5 \times 10^7$ e $4,5 \times 10^7$ UFC/g para *L. paracasei* no terceiro dia de fermentação de salame tipo Húngaro.

Tabela 15 – Estimativa da população probiótica (UFC/g) do salame tipo Italiano, durante período de armazenamento

| Tratamentos | Tempo de armazenamento (dias) | | | | |
|-------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | massa | 0 (salame maturado) | 30 | 60 | 90 |
| T1 | - | - | - | - | - |
| T2 | 9x10 ⁸ UFC/g | 2x10 ⁸ UFC/g | 2,5x10 ⁸ UFC/g | 3,5x10 ⁷ UFC/g | 1x10 ³ UFC/g |
| T3 | 5x10 ⁷ UFC/g | 1x10 ⁸ UFC/g | 1x10 ⁷ UFC/g | 4x10 ⁵ UFC/g | 1,5x10 ² UFC/g |
| T4 | 1x10 ⁸ UFC/g | 1,7x10 ⁹ UFC/g | 4x10 ⁷ UFC/g | 5x10 ⁷ UFC/g | 4,5x10 ³ UFC/g |
| T5 | 4x10 ⁷ UFC/g | 9x10 ⁸ UFC/g | 1x10 ⁸ UFC/g | 4,5x10 ⁶ UFC/g | 2x10 ⁶ UFC/g |

T1: controle (sem probióticos); T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

Conforme os resultados das contagens no tempo 0 (salame maturado), os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre, obtiveram valores de 2x10⁸ UFC/g e 1,7x10⁹ UFC/g, respectivamente, já os tratamentos com microcápsulas *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* (T3 e T5) apresentaram contagens de 1x10⁸ e 9x10⁸ UFC/g, respectivamente, constatando que o meio estava favorável para a multiplicação destes microrganismos e mantendo o número de células viáveis estipuladas pela legislação brasileira, com base na porção diária de alimento, de 10⁸ a 10⁹ UFC/g/dia.

Após 30 dias de processamento, a estimativa da população de *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) foi de 2,5x10⁸ UFC/g e para o *Bifidobacterium lactis* livre (T4) de 4x10⁷ UFC/g, com redução de um ciclo logarítmico, para o T4. Os demais tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T3) e *Bifidobacterium lactis* (T5) ambos encapsulados, apresentaram contagens de 1x10⁷ UFC/g e 1x10⁸ UFC/g, respectivamente constatando-se que as culturas probióticas apresentaram elevado número de células viáveis nos salames tipo Italiano para este período (Figura 22). Resultados semelhantes foram obtidos por Pidcock, Heard e Henriksson (2002) que trabalharam com *Lactobacillus paracasei* e obtiveram valores para salame tipo Húngaro, após 21 dias, de 1,3x10⁸ a 3,5x10⁸ UFC/g.

Entretanto, as contagens dos tratamentos *Lactobacillus acidophilus* livre (T2),

Lactobacillus acidophilus encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) decresceram aos 60 dias de armazenamento, estando de acordo com o relatado por Pidcock, Heard e Henriksson (2002) que verificaram redução na população no 42º dia após o processamento, obtendo número de células de $1,6 \times 10^6$ a $5,5 \times 10^7$ UFC/g. As contagens decresceram para os tratamentos na forma livre, possivelmente devido ao novo ambiente gerado, com excesso de metabólitos (ácidos e bacteriocinas) no meio, que causaram injúria nas células. No caso dos microrganismos encapsulados, como a acidificação foi menor nesses tratamentos (T3 e T5) que naqueles com os microrganismos livres (T2 e T4) e similar ao controle (T1), sugere-se que a atividade metabólica desses microrganismos tenha sido inibida e que, possivelmente, por estarem encapsulados, estes microrganismos não puderam interagir com o meio. Assim, a causa da redução da contagem destes pode ser atribuída à ausência de nutrientes na microcápsula para garantir a sobrevivência das células por um período mais prolongado.

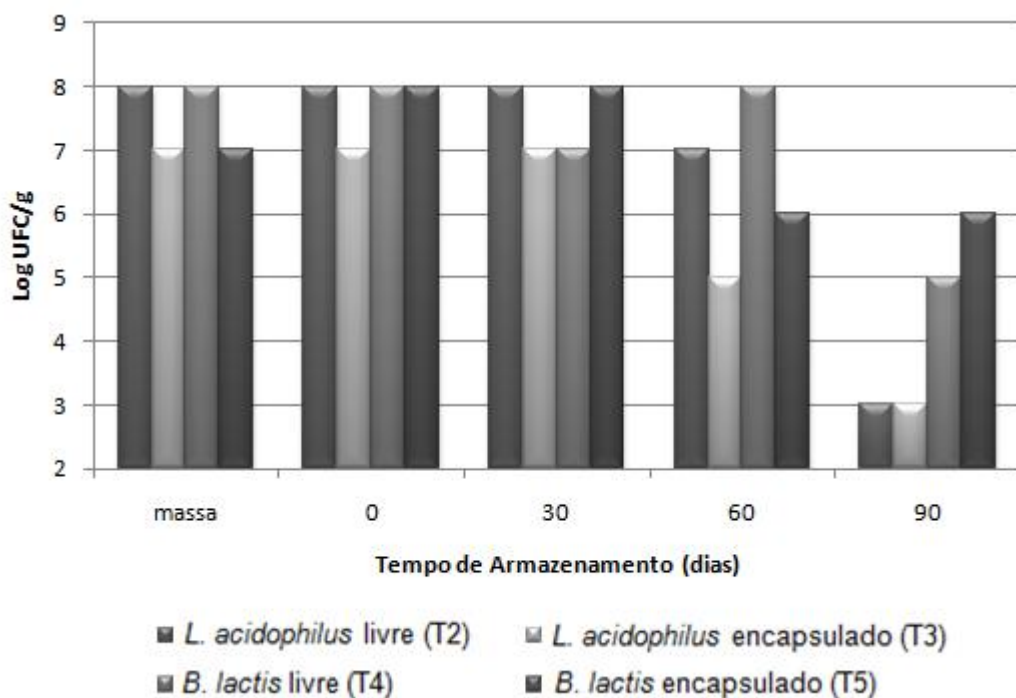


Figura 22 – Valores médios da contagem de culturas probióticas nas amostras de salame tipo Italiano por tempo de armazenamento

Para Tharmaraj e Shah (2003) os alimentos com propriedades probióticas devem conter um número mínimo de população microbiana, sendo estimada em 10^6 UFC/g do produto para obtenção de efeitos benéficos e colonização do intestino. Atualmente, a legislação brasileira recomenda, com base na porção diária de alimento que o mínimo estipulado seja de 10^8 a 10^9 UFC/g/dia (BRASIL, 2007). Desta forma, aos 90 dias de armazenamento nenhum dos quatro tratamentos com culturas probióticas atingiu estas contagens, somente o tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) que se manteve com 10^6 UFC/g neste período. Fato que se deve, provavelmente, a encapsulação que aumentou a estabilidade das células, todavia, para garantir maior viabilidade do que a alcançada neste trabalho, a microcápsula deveria ter sido enriquecida com nutrientes ou os microrganismos deveriam estar na forma inerte e não na forma ativa (como era o caso, já que estavam em uma gotícula).

O tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) obteve populações viáveis até o 30º dia de armazenamento, por sua vez o tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4), manteve-se viável na massa e nos tempo 0 (salame maturado) e 60 dias de armazenamento, enquanto que o tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) apresentou um número mínimo de população estimada em 10^7 UFC/g manteve-se viável na massa, tempo 0 (salame maturado) e 30 dias. A perda da viabilidade durante o armazenamento pode estar relacionada a uma série de fatores, incluindo formação de radicais livres na presença de oxigênio, oxidação de ácidos graxos e danos no DNA das células (CASTRO, TEIXEIRA ; KIRBY, 1997, citado por PEDROSO, 2011).

De acordo com os resultados obtidos neste estudo e considerando-se os objetivos propostos, pode-se concluir que a microencapsulação por *spray chilling* foi positiva para os microrganismos *Bifidobacterium lactis* (T5), pois proporcionou a contagem de 10^6 UFC/g aos 90 dias de armazenamento. Entretanto, o *Bifidobacterium lactis* livre (T4), assegurou que um nível desejado de microrganismos probióticos recomendados pela legislação brasileira fosse mantido no produto até o 60º dia.

4.2.8 Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas empregadas no processo de produção de salames são importantes para garantir a acidificação do produto pela produção de ácido láctico. É

importante que ocorra diminuição rápida do pH para evitar o desenvolvimento de microrganismos tanto deteriorantes como patogênicos.

Os valores obtidos na massa de 10^8 UFC/g encontram-se acima dos relatados por Bruna et al. (2001), Aro Aro (2010), Del Nobile et al. (2009) onde observaram contagens de 10^6 a 10^7 UFC/g para a massa. Por sua vez, no tempo 0 (salame maturado) as contagens de 10^9 UFC/g estão coerentes com as contagens relatadas por estes mesmos autores de 10^3 a 10^9 UFC/g em embutidos fermentados e acima das contagens de 10^7 a 10^8 UFC/g argumentadas por Cirolini (2008) em trabalho com salames no 14º dia de fabricação. Este aumento na contagem das populações, deve-se ao abaixamento do pH na fase de fermentação, com consequente desenvolvimento das bactérias lácticas.

Nas amostras de salame analisadas, a contagem de bactérias lácticas (Figura 23) reduziu 1 ciclo logarítmico para todos os tratamentos do tempo 0 (salame maturado) para o 30º dia de armazenamento, com contagem de 10^9 para 10^8 acima dos valores relatados por Sanz et al. (1997), que obtiveram contagens de bactérias lácticas de $1,6 \times 10^6$ a $1,7 \times 10^6$ UFC/g no 34º dia. Para o tempo de 60 dias de armazenamento, observa-se a menor contagem para o tratamento T2 com 5×10^7 UFC/g.

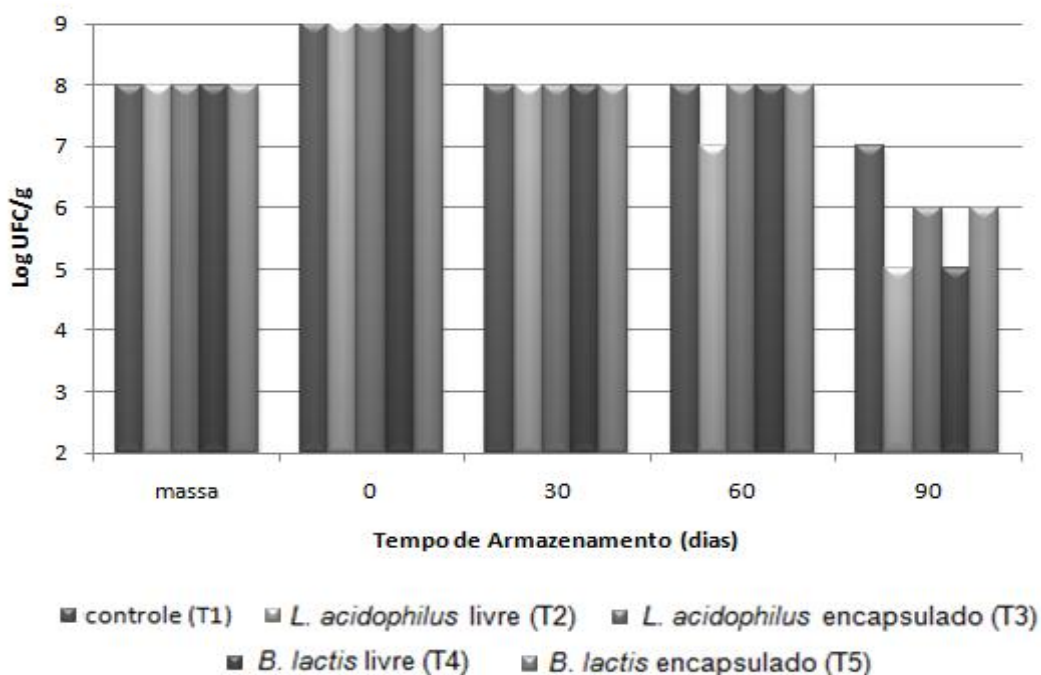


Figura 23 – Valores médios da contagem de bactérias lácticas nas amostras de salame tipo Italiano por tempo de armazenamento

Nas contagens obtidas para o tempo de 90 dias de armazenamento, os tratamentos *Lactobacillus acidophilus*(T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4), ambos na forma livre reduziram suas populações e apresentaram as menores contagens finais de 2×10^5 UFC/g, respectivamente. Por sua vez o tratamento controle (T1) obteve a maior contagem com 3×10^7 UFC/g. Os tratamentos encapsulados apresentaram contagens finais de 10^6 UFC/g, respectivamente. Estes resultados variáveis no decorrer do armazenamento são semelhantes aos citados por Greco et al. (2005); Soyer, Ertas e Üzümcüoglu (2005) e Comi et al. (2005) onde a concentração de bactérias lácticas se mantém estável durante a maturação, podendo ocorrer uma diminuição da viabilidade durante essa etapa. Os resultados obtidos por Ambrosiadis et al. (2004), que obtiveram contagens finais em torno de 10^4 e 10^8 UFC/g em salames tradicionais da Grécia são semelhantes aos obtidos neste trabalho.

A Figura 24 mostra uma placa com meio MRS contando colônias de bactérias lácticas presentes no salame.

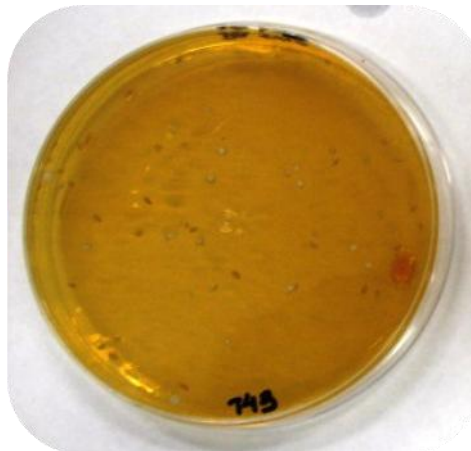


Figura 24 – Colônias de bactérias lácticas em meio MRS das amostras de salame tipo Italiano

4.2.9 Avaliação Microbiológica

Com o intuito de avaliar a qualidade microbiológica e segurança do produto final, foram realizadas as análises de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes a 45° e *Salmonella* spp. em amostras de salame dos processamentos 1 e 4.

Na Tabela 16 encontram-se os resultados das análises realizadas com o intuito de definir o padrão microbiológico por amostra indicativa de salame para cada microrganismo previsto.

Tabela 16 – Análises microbiológicas realizadas nas amostras de salame tipo Italiano por tratamento

| Tratamentos | Coliformes a 45°C (UFC/g) | <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) | <i>Salmonella</i> spp. (em 25 g) |
|-------------|------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| T1 | <10 | <10 | ausente |
| T2 | <10 | <10 | ausente |
| T3 | <10 | <10 | ausente |
| T4 | <10 | <10 | ausente |
| T5 | <10 | <10 | ausente |

T1: controle (sem contagem de probióticos); T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

A leitura da placa Petrifilm Staph express apresentou presença de colônia preta ou azul-esverdeada. Para a confirmação do teste foi utilizado o disco Petrifilm Staph Express (Figura 25). O disco inserido na placa contém um indicador, o ácido desoxirribonucléico (DNA). O *S. aureus* produz desoxirribonuclease (DNase) e a DNase reage com o indicador para formar possíveis halos rosados. Como não houve a formação do halo rosado, concluiu-se que não ocorreu a multiplicação de *S. aureus*.

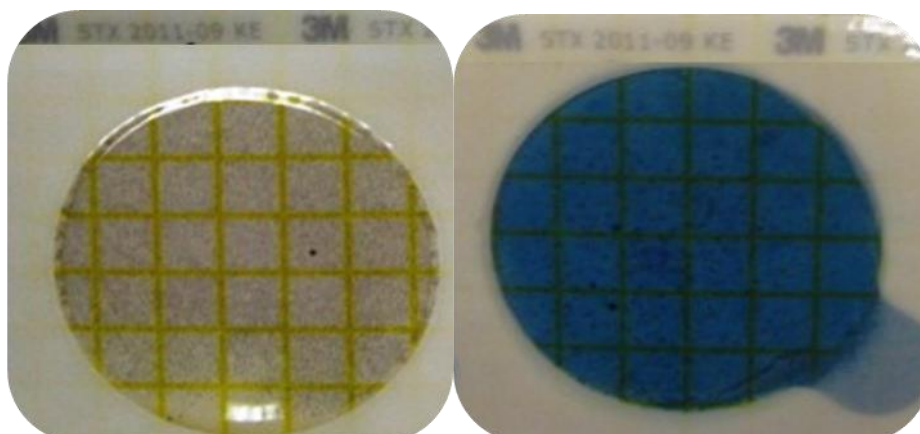


Figura 25 – Placa Petrifilm™ Staph Express 3M™ para Contagem Expressa de *Staphylococcus aureus* (STX) e Disco Petrifilm Staph Express

Como era esperado face aos valores de pH, atividade de água e acidez das amostras, constatou-se que não houve presença de *Salmonella* (Figura 26). As contagens de coliformes a 45°C (Figura 27) ficaram abaixo dos valores de 10^3 UFC/g de amostra, definido por BRASIL (2001). Em decorrência destes resultados, as amostras foram consideradas em condições apropriadas para o consumo do ponto de vista sanitário.



Figura 26 – Kit VIP® para *Salmonella*. A presença de 1 faixa vermelha no retângulo indica a negatividade de sua presença em 25 g de amostra analisada



Figura 27 – Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de Coliformes (EC). Sem crescimento de coliformes em amostras de salame tipo Italiano

4.3 Análise Sensorial

4.3.1 Aparência

Considerando-se os resultados obtidos na análise da variância para o tempo 0 (salame maturado), conforme mostra a Tabela 17, constatou-se que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) dos tratamentos para este atributo.

Tabela 17 - Valores médios (\pm desvios padrões) para o atributo aparência nas amostras de salame tipo Italiano ($n=60$ consumidores)

| Tratamentos | Aparência | | | |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | Tempo de Armazenamento (dias) | | | |
| | 0 (salame maturado) | 30 | 60 | 90 |
| T1 | 6,7 \pm 1,56 ^b | 6,9 \pm 1,46 ^b | 7,1 \pm 1,69 ^a | 7,5 \pm 1,31 ^{ab} |
| T2 | 7,5 \pm 1,44 ^a | 7,1 \pm 1,61 ^{ab} | 7,6 \pm 1,40 ^a | 7,7 \pm 1,12 ^a |
| T3 | 7,1 \pm 1,53 ^{ab} | 7,4 \pm 1,27 ^{ab} | 7,4 \pm 1,24 ^a | 7,5 \pm 1,32 ^{ab} |
| T4 | 7,8 \pm 1,28 ^a | 7,8 \pm 1,32 ^a | 7,7 \pm 1,36 ^a | 7,5 \pm 1,13 ^{ab} |
| T5 | 7,3 \pm 1,44 ^{ab} | 7,2 \pm 1,57 ^{ab} | 7,6 \pm 1,20 ^a | 7,1 \pm 1,41 ^b |
| DMS | 0,75 | 0,72 | 0,69 | 0,63 |

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

DMS: Diferença mínima significativa

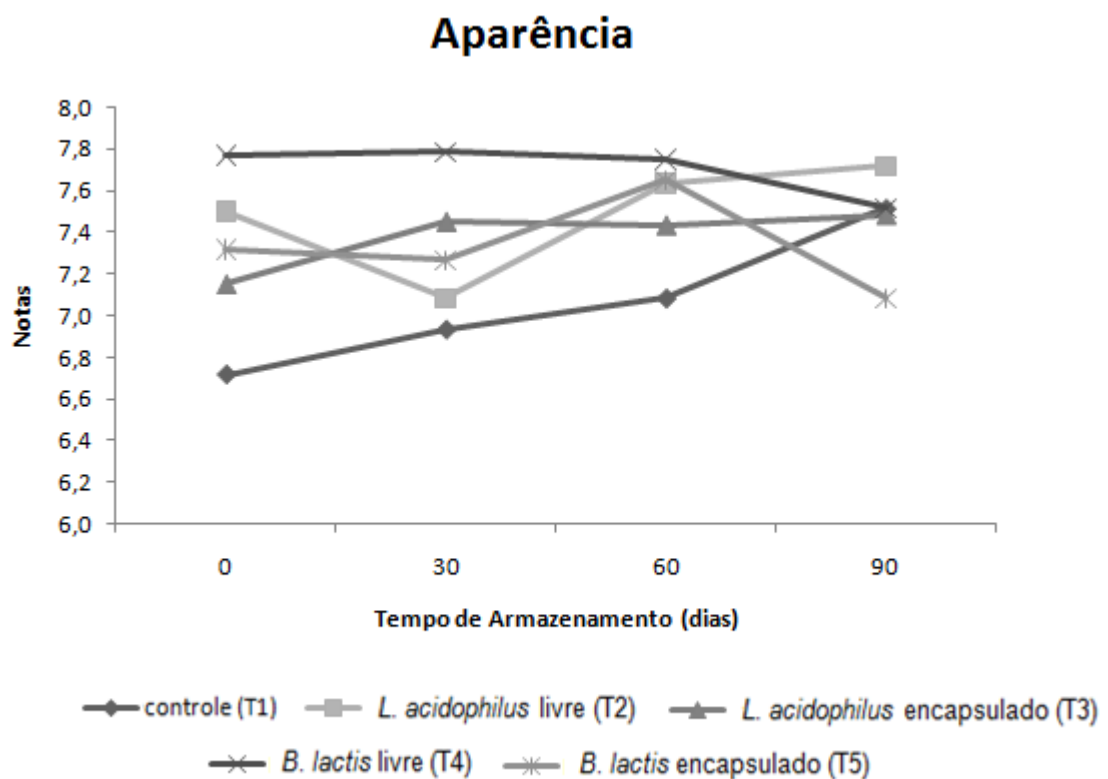
T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei / nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.

No tempo 0 (salame maturado), observa-se que os tratamentos com *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre, receberam as maiores médias de 7,5 e 7,8, respectivamente, o que corresponde na escala hedônica entre “gostei moderadamente” e “gostei muito”. Estas maiores pontuações provavelmente estão relacionadas ao menor valor de L* e menor teor de atividade de água para estes tratamentos, fato que tornou a superfície das amostras mais escuras, tendo-se como cor tradicional dos salames o vermelho escuro. Estes

tratamentos diferenciaram-se estatisticamente ($p \leq 0,05$) do tratamento controle (T1) que apresentou a menor média de 6,7, correspondente na escala hedônica entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente” (Figura 28).

Ao longo do armazenamento, a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre as amostras se manteve, porém com algumas oscilações. Conforme os resultados, o tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4) apresentou as maiores médias de aceitação da ordem de 7,8, fato que classifica esta amostra como próxima a “gostei muito” na escala hedônica, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) do tratamento controle (T1) que apresentou a menor média de 6,9.



1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei / nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.
 Figura 28 – Valores médios de aceitação do atributo aparência nas amostras de salame tipo Italiano por tempo de armazenamento

Entre os períodos de 60 e 90 dias de armazenamento, os tratamentos *Bifidobacterium lactis* livre (T4) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) apresentaram um decréscimo de 7,7 para 7,5 (T4) e de 7,6 para 7,1 (T5). Já para os tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) e *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) as médias aumentaram aos 90 dias de 7,1 a 7,5 (T1),

7,6 a 7,7 (T2) e 7,4 a 7,5 (T3), finalizando com valores entre 7 “gostei moderadamente” e 8 “gostei muito” na classificação. As notas de aparência do salame controle (T1), ao longo do tempo de armazenamento melhoraram, passando de 6,7 no tempo 0 (salame maturado) para 7,5 no tempo de 90 dias, ficando similares aos demais tratamentos.

De uma forma geral, os salames com culturas probióticas obtiveram boa aceitação entre os consumidores quanto à aparência, especialmente os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) e *Bifidobacterium lactis* livre (T4) que obtiveram 7,7 e 7,5, respectivamente, classificados entre “gostei moderadamente” e “gostei muito” na escala hedônica. Ao longo do armazenamento, o *Bifidobacterium lactis* livre (T4) foi o tratamento que se mostrou mais estável quando comparado aos demais.

4.3.2 Textura

Conforme os resultados estatísticos para o atributo textura (Tabela 18) observa-se que no tempo 0 (salame maturado), as notas médias variaram entre 6,7 a 7,3 próximas à classificação 7 “gostei moderadamente” da escala hedônica, não sendo verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$). Já para o atributo textura do Ensaio 1, foram detectadas diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. O tratamento *Bifidobacterium lactis* (BI) obteve média de 6,4, diferindo dos tratamentos controle (C) e *Lactobacillus acidophilus* (La) que obtiveram aceitação média de 7,3 e 6,8, respectivamente.

Tabela 18 - Valores médios (\pm desvios padrões) para o atributo textura nas amostras de salame tipo Italiano ($n=60$ consumidores)

| Tratamentos | Textura | | | |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | Tempo de Armazenamento (dias) | | | |
| | 0 (salame maturado) | 30 | 60 | 90 |
| T1 | 6,7 \pm 1,75 ^a | 6,9 \pm 1,51 ^{ab} | 7,1 \pm 1,48 ^a | 7,2 \pm 1,43 ^a |
| T2 | 6,8 \pm 1,66 ^a | 6,4 \pm 1,91 ^b | 7 \pm 1,71 ^a | 7 \pm 1,71 ^a |
| T3 | 7,3 \pm 1,48 ^a | 7,5 \pm 1,16 ^a | 7,7 \pm 1,35 ^a | 7,3 \pm 1,43 ^a |
| T4 | 7,1 \pm 1,59 ^a | 7 \pm 1,64 ^b | 7 \pm 1,76 ^a | 6,9 \pm 1,56 ^a |
| T5 | 7,1 \pm 1,41 ^a | 7,3 \pm 1,29 ^a | 7,2 \pm 1,47 ^a | 6,7 \pm 1,82 ^a |
| DMS | 0,79 | 0,75 | 0,78 | 0,80 |

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p\leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

DMS: Diferença mínima significativa

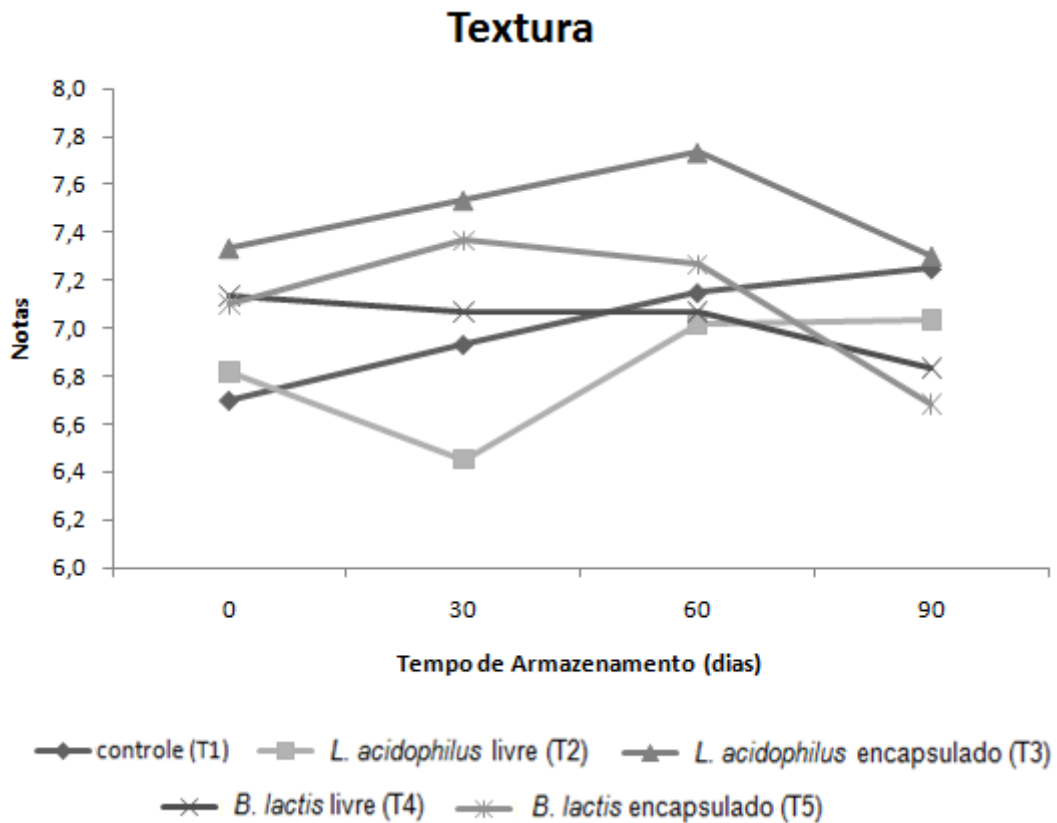
T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei /nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.

Aos 30 dias de armazenamento os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) apresentaram as maiores pontuações de 7,5 e 7,3, respectivamente, situados entre “gostei moderadamente” e “gostei muito”, havendo diferença significativa ($p\leq 0,05$) frente ao *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) com 6,4 e *Bifidobacterium lactis* livre (T4) com 7. A menor média para o *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), deve-se, provavelmente, ao fato de que os tratamentos com culturas probióticas na forma livre obtiveram os menores valores de pH final, Aw e acidez, além de apresentarem os maiores valores de perda de peso quando comparados aos demais tratamentos. Segundo Fernández et al. (2000), a textura dos salames é influenciada pela umidade final do produto, portanto todos os fatores que interferem no processo de desidratação dos salames podem provocar alterações na textura.

No tempo 60 dias de armazenamento, os tratamentos não diferenciaram entre si ($p>0,05$). Os menores valores verificados foram dos tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre, com média de 7,

ou seja, “gostei moderadamente”. Entretanto, o tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) obteve a maior pontuação 7,7 próximo à classificação “gostei muito”. Os resultados da análise de variância aos 90 dias mostraram que não foi detectada diferença estatística ($p>0,05$) entre os tratamentos, apresentando médias que variaram de 6,7 a 7,3 classificados como “gostei moderadamente” (Figura 29).



1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei /nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.

Figura 29 – Valores médios de aceitação do atributo textura nas amostras de salame tipo Italiano por tempo de armazenamento

Através dos resultados estatísticos obtidos, os salames com culturas probióticas apresentaram, em geral, boa aceitação entre os consumidores quanto à textura, especialmente o tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) que obteve média de 7,3 aos 90 dias de armazenamento, classificada entre “gostei moderadamente” e “gostei muito” na escala hedônica. Por sua vez, constatou-se que apesar de não apresentarem diferenças significativas entre os tratamentos, o *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) mostrou-se ligeiramente superior em

todos os tempos e as notas do tratamento controle (T1), ao longo do tempo de armazenamento melhoraram, passando de 6,7 no tempo 0 (salame maturado) para 7,2 no tempo 90 dias.

4.3.3 Sabor

Para o atributo sabor (Tabela 19) no tempo 0 (salame maturado), não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos. As médias variaram de 6,4 a 7,1 correspondentes na escala entre “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. Entre todos os atributos avaliados o sabor foi o que teve maior desvio padrão, indicando uma maior variabilidade nas notas dos consumidores.

Tabela 19 - Valores médios (\pm desvios padrões) para o atributo sabor nas amostras de salame tipo Italiano ($n=60$ consumidores)

| Tratamentos | Sabor | | | |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Tempo de Armazenamento (dias) | | | |
| | 0 (salame maturado) | 30 | 60 | 90 |
| T1 | 7 \pm 1,65 ^a | 7,1 \pm 1,51 ^a | 7,6 \pm 1,28 ^a | 6,5 \pm 2,20 ^{ab} |
| T2 | 7 \pm 1,66 ^a | 6,8 \pm 1,80 ^{ab} | 7,3 \pm 1,61 ^a | 6,9 \pm 1,96 ^a |
| T3 | 7,1 \pm 1,76 ^a | 7,2 \pm 1,20 ^a | 7,3 \pm 1,28 ^a | 6,6 \pm 1,82 ^{ab} |
| T4 | 6,9 \pm 1,91 ^a | 6,8 \pm 1,81 ^a | 6,8 \pm 1,96 ^{ab} | 7,1 \pm 1,81 ^a |
| T5 | 6,4 \pm 2,08 ^a | 5,9 \pm 2,27 ^b | 6,2 \pm 2,21 ^b | 5,6 \pm 2,30 ^b |
| DMS | 0,91 | 0,87 | 0,85 | 1,01 |

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p\leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

DMS: Diferença mínima significativa

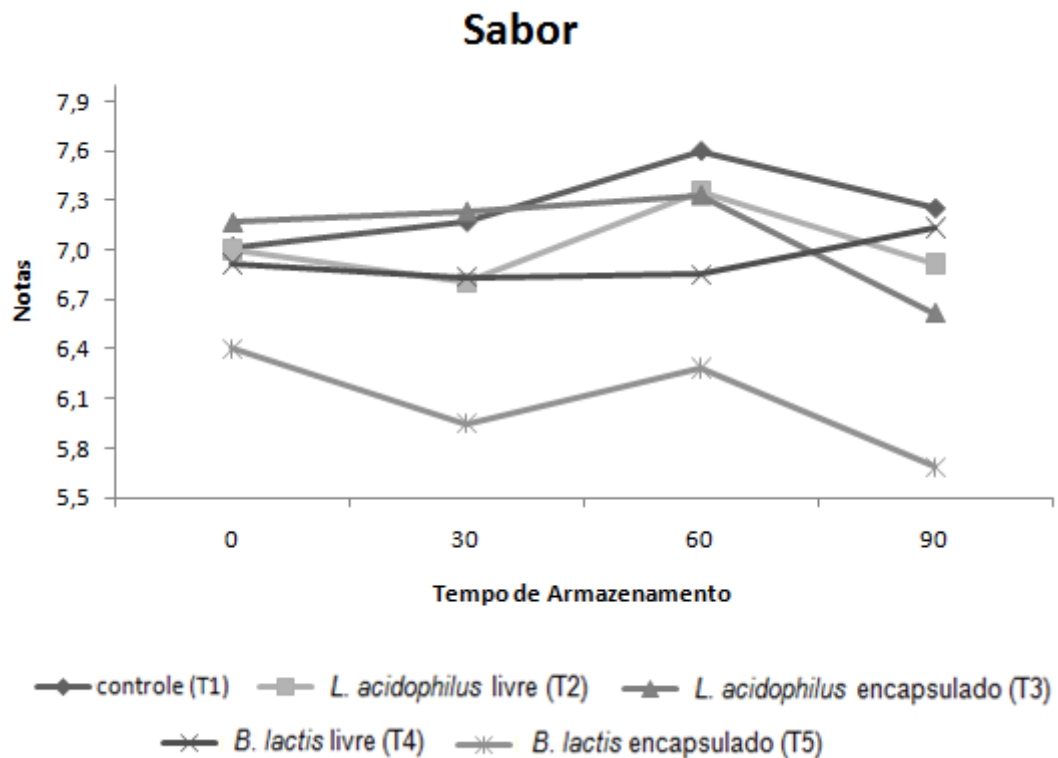
T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei / nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.

Conforme o resultado estatístico aos 30 dias de armazenamento verificou-se que o tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) apresentou a menor média, 5,9, diferindo estatisticamente ($p\leq 0,05$) dos demais tratamentos, próxima a

aceitação “gostei ligeiramente” na escala. A menor média obtida para o este tratamento provavelmente está relacionada com o índice de TBARS, uma vez que para o mesmo período (tempo 30) este tratamento T5 apresentou as maiores médias de mg de MAD/kg. Os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* (T2) e *Bifidobacterium lactis* (T4) ambos na forma livre, tiveram suas médias reduzidas para 6,8. Esta pontuação para o atributo sabor, no presente trabalho, é superior ao observado por Macedo (2005) que obteve médias de 6,3 para *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei casei* e 6 para *Lactobacillus casei*, após 54 dias de armazenamento.

Para os salames dos tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) constatou-se um aumento nas pontuações do 30° para o 60° dia de armazenamento e foram observadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos. O tratamento controle (T1) obteve a maior média, de 7,6, entre “gostei moderadamente” e “gostei muito”, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) com média, 6,2. Através dos resultados obtidos, verifica-se uma melhora gradativa do tratamento controle (T1), sendo pontuado como a melhor amostra para este período. Provavelmente este tratamento necessitou de um maior tempo de maturação para desenvolver as características típicas do salame. Entretanto, o *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) apresentou a menor média, de 6,2, com aceitação próxima “gostei ligeiramente” (Figura 30).



1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei / nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.
 Figura 30 – Valores médios de aceitação do atributo sabor nas amostras de salame tipo Italiano por tempo de armazenamento

Para o tempo de 90 dias, os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) e *Bifidobacterium lactis* livre (T4) apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os demais tratamentos e obtiveram as maiores médias de 6,9 e 7,1, respectivamente, correspondentes na escala próxima a “gostei moderadamente”. Provavelmente estas pontuações estão relacionadas ao sabor ácido observado por 61,7% dos provadores, que segundo Frosi (2002) constitui-se na característica preferida pelo consumidor brasileiro para os salames. Ambrosiadis et al. (2004) verificaram em salames tradicionais da Grécia que amostras com maiores escores em relação ao sabor foram as melhores avaliadas em relação à aparência, o que está de acordo com o presente trabalho. O tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) obteve média 6,6, seguido do tratamento controle (T1) com média 6,5. O tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) novamente apresentou a menor pontuação 5,6, que por sua vez, apresentou a maior contagem de células viáveis para o mesmo período, ou seja, houve a multiplicação de suas células. Provavelmente, a incorporação das microcápsulas afetou sensorialmente o sabor,

devido à rancificação das amostras observadas através dos comentários relatados na ficha de avaliação, onde 36,7% dos provadores detectaram sensorialmente indícios de ranço.

Os salames com culturas probióticas apresentaram em geral boa aceitação, pois suas pontuações foram semelhantes à do salame controle e classificados como “gostei moderadamente” na escala hedônica.

4.3.4 Aceitação global

A avaliação sensorial do atributo aceitação global (Tabela 20) para o tempo 0 (salame maturado) não apresentou diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos. As pontuações dos salames variaram de 6,8 a 7,2 correspondentes com a classificação “gostei moderadamente”.

O atributo aceitação global decresceu no tempo 30 dias para os tratamentos *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), *Bifidobacterium lactis* livre (T4) e *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5), com maior evidência para o T5, o qual decresceu de 6,9 para 6,2, ou seja, próximo à classificação “gostei ligeiramente”, sendo constatada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Para este mesmo período, a maior média foi observada no tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) de 7,3, ficando com a classificação próxima a “gostei moderadamente” na escala hedônica utilizada.

Tabela 20 - Valores médios (\pm desvios padrões) para o atributo aceitação global nas amostras de salame tipo Italiano ($n=60$ consumidores)

| Tratamentos | Aceitação Global | | | |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | Tempo de Armazenamento (dias) | | | |
| | 0 (salame maturado) | 30 | 60 | 90 |
| T1 | 6,8 \pm 1,47 ^a | 6,9 \pm 1,33 ^{ab} | 7,3 \pm 1,53 ^{ab} | 6,8 \pm 1,95 ^{ab} |
| T2 | 7,2 \pm 1,36 ^a | 6,7 \pm 1,66 ^{ab} | 7,3 \pm 1,45 ^{ab} | 6,9 \pm 1,91 ^{ab} |
| T3 | 7 \pm 1,65 ^a | 7,3 \pm 1,18 ^a | 7,5 \pm 1,20 ^a | 6,9 \pm 1,58 ^{ab} |
| T4 | 7,2 \pm 1,73 ^a | 7,1 \pm 1,55 ^a | 6,9 \pm 1,89 ^{ab} | 7,2 \pm 1,39 ^a |
| T5 | 6,9 \pm 1,63 ^a | 6,2 \pm 2,01 ^b | 6,6 \pm 1,81 ^b | 6,2 \pm 2,27 ^b |
| DMS | 0,78 | 0,78 | 0,79 | 0,92 |

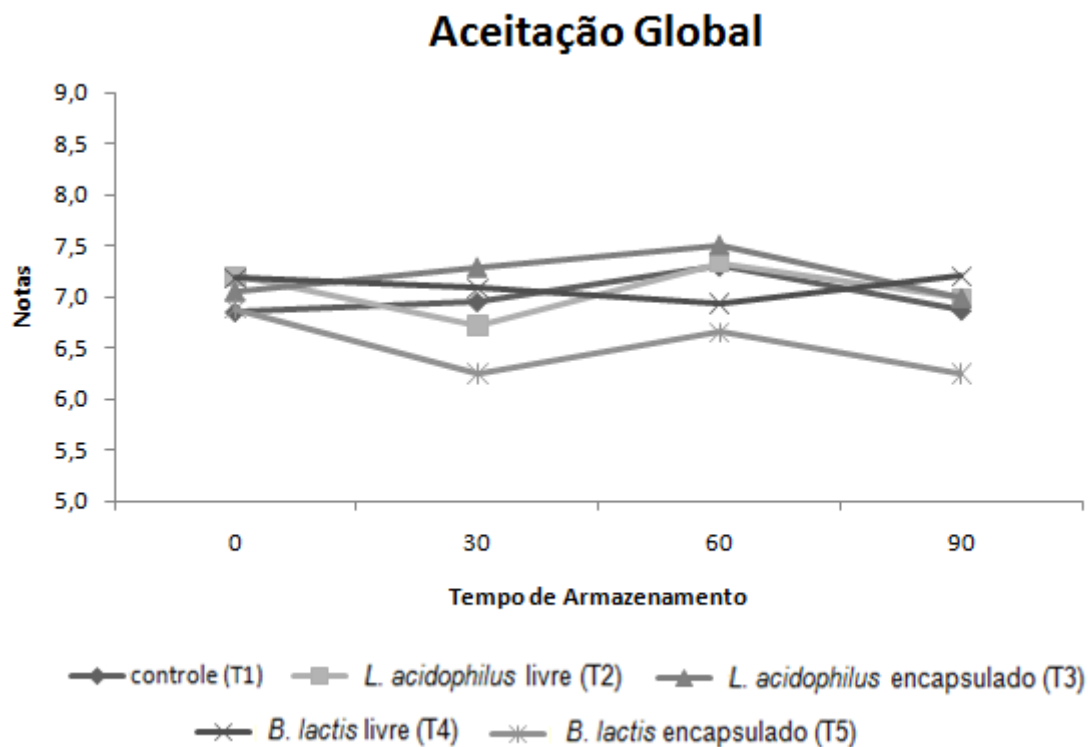
Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

DMS: Diferença mínima significativa

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei / nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.

Conforme a análise de variância aos 60 dias verificou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. As maiores pontuações encontradas foram para os tratamentos controle (T1), *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) e *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) com médias de 7,3, 7,3 e 7,5, respectivamente, entre “gostei moderadamente” e “gostei muito”. O tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) diferiu significativamente ($p < 0,05$) do tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5), que obteve média 6,6. O tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4) apresentou um decréscimo no 60º dia para 6,9, com posterior aumento ao final do período de armazenamento de 7,2, próximo à classificação “gostei moderadamente” (Figura 31).



1=desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei / nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo.

Figura 31 – Valores médios do atributo aceitação global nas amostras de salame tipo Italiano, por tempo de armazenamento

De acordo com os resultados estatísticos observados no tempo 90 dias, o tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4) apresentou a maior média (7,2) no atributo aceitação global, mostrando-se bem apreciado pelos provadores e diferenciando-se significativamente ($p < 0,05$) do tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) que obteve a menor pontuação para este período de 6,2, ou seja, próximo à classificação “gostei ligeiramente”. No 90º dia, o desvio padrão do T5 foi o maior de todos os tratamentos, indicando maior variabilidade nas notas dos consumidores.

De forma geral, o tempo de armazenamento afetou as pontuações de aceitação global das amostras por apresentar diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) na maior parte do período. Os salames *Lactobacillus acidophilus* livre (T2), *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) e *Bifidobacterium lactis* livre (T4) apresentaram em geral boa aceitação, com valores médios entre 6,9 e 7,2 sendo classificados como “gostei moderadamente” na escala hedônica. Por sua vez, o *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) foi o tratamento menos aceito entre os consumidores, com média de 6,2, próximo à classificação “gostei ligeiramente”.

4.3.5 Intenção de compra

Os resultados referentes ao questionamento sobre a intenção de compra dos consumidores, frente às amostras analisadas nos tempos 0 (salame maturado), 30, 60 e 90 dias de armazenamento podem ser vistos na Tabela 21.

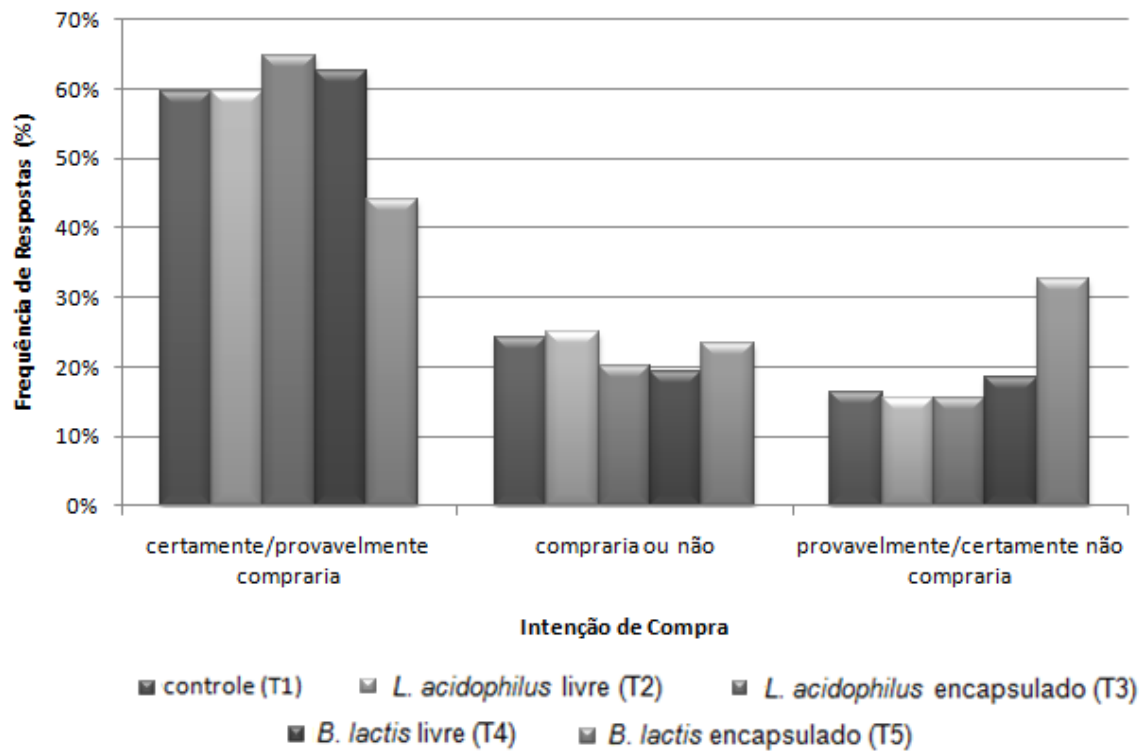
Tabela 21 – Intenção de compra dos consumidores (em %) das amostras de salame tipo Italiano ($n=60$ consumidores), por tratamento

| Intenção de compra (%) | Tratamentos | | | | |
|-----------------------------|-------------|------|------|------|------|
| | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| Certamente não compraria | 3,4 | 3,8 | 1,7 | 6,3 | 11,7 |
| Provavelmente não compraria | 12,9 | 11,7 | 13,8 | 12,1 | 20,9 |
| Compraria ou não | 24,2 | 25 | 20 | 19,2 | 23,3 |
| Provavelmente compraria | 30,8 | 30,4 | 33,8 | 29,2 | 28,4 |
| Certamente compraria | 28,7 | 29,2 | 30,9 | 33,3 | 15,8 |

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

1= certamente não compraria; 2= provavelmente não compraria; 3= talvez compraria / talvez não compraria; 4= provavelmente compraria; 5= certamente compraria.

Observa-se que os índices de intenção de compra seguem a mesma tendência dos resultados de aceitação global. O tratamento *Lactobacillus acidophilus* encapsulado (T3) obteve a maior intenção de compra do somatório “certamente compraria” com “provavelmente compraria” com 64,7%, seguido do tratamento *Bifidobacterium lactis* livre (T4) com 62,5%. Os demais tratamentos T1, T2 e T5 obtiveram 59,5%, 59,6% e 44,2%, respectivamente, apresentaram alta intenção de compra, bem como o tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) que diferiu em 7,8% do tratamento de maior pontuação. Do total de consumidores entrevistados, a maior porcentagem de indiferença (compraria ou não) na intenção de compra foi do tratamento *Lactobacillus acidophilus* livre (T2) com 25%, seguido do tratamento controle com 24,2% e do tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) com 23,3%. Quanto à rejeição (certamente/provavelmente não compraria) a maior porcentagem foi do tratamento *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5) que obteve 32,6% (Figura 32).



1= certamente não compraria; 2= provavelmente não compraria; 3= talvez compraria / talvez não compraria; 4= provavelmente compraria; 5= certamente compraria.

Figura 32 – Distribuição de frequência de intenção de compra pelos provadores nas amostras de salame tipo Italiano

De acordo com os resultados estatísticos ao longo dos 90 dias de armazenamento verificam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos no tempo 30, 60 e 90 dias de armazenamento (Tabela 22).

Tabela 22 - Valores médios (\pm desvios padrões) para a intenção de compra nas amostras de salame tipo Italiano ($n=60$ consumidores), por tempo de armazenamento

| Tratamentos | Intenção de Compra | | | |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | Tempo de Armazenamento (dias) | | | |
| | 0 (salame maturado) | 30 | 60 | 90 |
| T1 | 3,5 \pm 1,20 ^a | 3,6 \pm 1,10 ^{ab} | 3,8 \pm 0,95 ^a | 3,6 \pm 1,21 ^a |
| T2 | 3,8 \pm 1,26 ^a | 3,5 \pm 1,14 ^{ab} | 3,7 \pm 1,04 ^a | 3,7 \pm 1,23 ^a |
| T3 | 3,7 \pm 1,13 ^a | 3,9 \pm 0,93 ^a | 3,8 \pm 1,14 ^a | 3,5 \pm 1,09 ^a |
| T4 | 3,8 \pm 1,20 ^a | 3,8 \pm 1,13 ^a | 3,5 \pm 1,30 ^{ab} | 3,6 \pm 1,28 ^a |
| T5 | 3,5 \pm 1,36 ^a | 3,2 \pm 1,36 ^b | 3,1 \pm 1,12 ^b | 2,7 \pm 1,28 ^b |
| DMS | 0,5 | 0,56 | 0,55 | 0,6 |

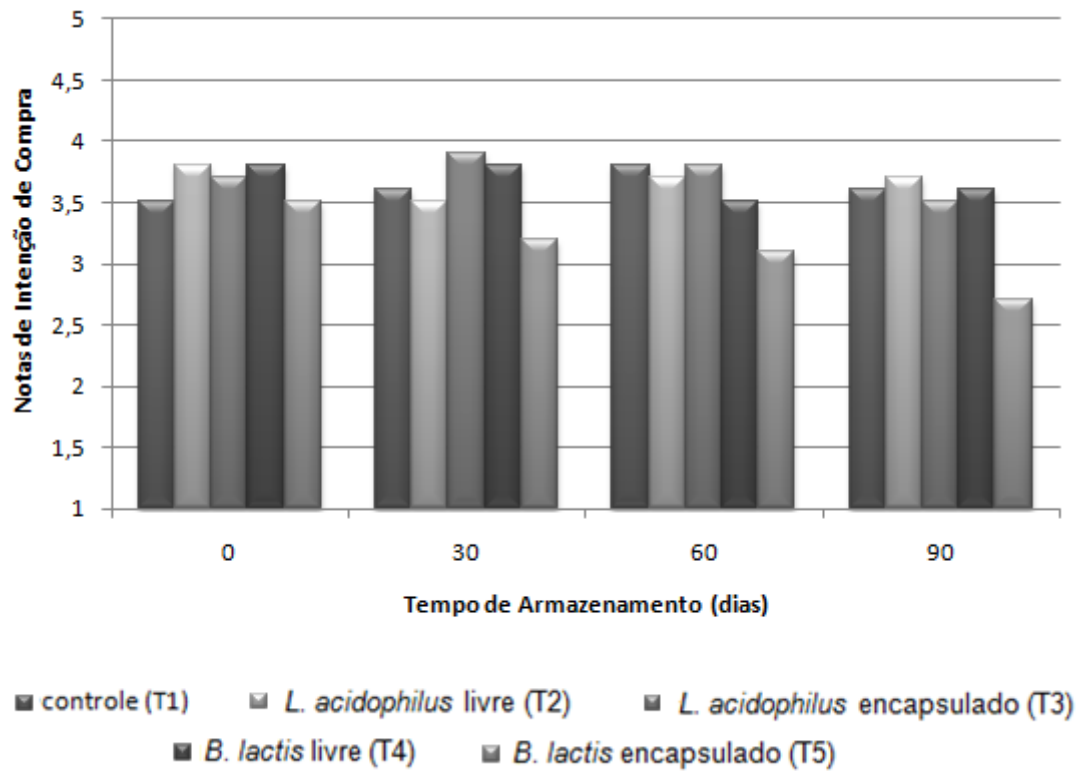
Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

DMS: Diferença mínima significativa

T1: controle; T2: *Lactobacillus acidophilus* livre; T3: *Lactobacillus acidophilus* encapsulado; T4: *Bifidobacterium lactis* livre; T5: *Bifidobacterium lactis* encapsulado.

1= certamente não compraria; 2= provavelmente não compraria; 3= talvez compraria / talvez não compraria; 4= provavelmente compraria; 5= certamente compraria.

A menor pontuação foi do salame *Bifidobacterium lactis* encapsulado (T5), fato que pode ser devido a uma menor aceitação no atributo sabor. Por sua vez, as notas dos demais tratamentos permaneceram entre 3,5 e 3,9 ao longo do período, o que contribuiu para a alta intenção de compra. Considerando que mais de 50% dos consumidores entrevistados manifestaram estar dispostos a comprar estes produtos, isso torna as amostras dos tratamentos controle, *Lactobacillus acidophilus* livre, *Lactobacillus acidophilus* encapsulado e *Bifidobacterium lactis* livre como as mais aceitas (Figura 33).



1= certamente não compraria; 2= provavelmente não compraria; 3= talvez compraria / talvez não compraria; 4= provavelmente compraria; 5= certamente compraria.

Figura 33 – Notas de intenção de compra para as amostras de salame tipo Italiano, por tempo de armazenamento

5 CONCLUSÃO

A utilização das culturas probióticas interferiram positivamente nas características físico-químicas e sensoriais dos salames. Há evidências de que os salames desenvolvidos neste trabalho, independente da cultura probiótica e da forma apresentada, possuem um grande potencial de venda no mercado consumidor.

Os salames que receberam adição de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, ambos na forma livre, apresentaram as menores médias de pH, atividade de água (Aw) e perda de peso, bem como os maiores valores para a determinação de acidez, além de exibirem o melhor perfil sensorial quanto à aparência, sabor e aceitação global. A cultura probiótica *Bifidobacterium lactis*, assegurou que um nível desejado de microrganismos probióticos recomendados pela legislação brasileira fosse mantido no produto somente até o 60º dia de armazenamento.

A cultura probiótica *Bifidobacterium lactis* na forma encapsulada demonstrou maior capacidade de multiplicação no embutido fermentado cárneo, em comparação aos demais tratamentos. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a microencapsulação por *spray chilling* foi vantajosa, pois proporcionou a contagem de 10^6 UFC/g ao final dos 90 dias de armazenamento. Por sua vez, esta mesma cultura exibiu as menores pontuações nos atributos sabor, aceitação global e intenção de compra. Provavelmente, a incorporação das microcápsulas afetou sensorialmente o sabor dessas amostras, devido à rancificação observadas através dos comentários relatados na ficha de avaliação, onde 36,7% dos provadores detectaram sensorialmente indícios de ranço.

O final da vida útil foi baseado nos comentários emitidos pelos consumidores, uma vez que odores de ranço não são desejáveis em embutidos fermentados. Portanto, decidiu-se paralisar a vida útil aos 90 dias de armazenamento.

Os tratamentos com microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* apresentaram as maiores pontuações quanto à textura e a maior média na intenção de compra com 64,7% do somatório “certamente compraria” com “provavelmente compraria”, não sendo relatados indícios de ranço para estas amostras.

Em princípio, é possível se produzir salames com culturas probióticas. No entanto, os salames devem ser projetados de tal forma que os microrganismos possam manter sua viabilidade até o produto final. Qualquer grande redução de pH,

tempo de maturação e secagem tem o potencial para fazer o efeito probiótico questionável, ou seja, danificar a cultura incorporada.

REFERÊNCIAS

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

AMMOR, M.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, Oxford, v. 76, n. 1, p.138-146, 2007.

ANDERSEN, L. Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: INTERNATIONAL COMMITMENT OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 44, 1998, Barcelona. **Proceedings...** Barcelona: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, 1998.p. 826-827.

ANSELMO, G. C. S.; MATA, M. E. R. M.; RODRIGUES, E. Comportamento higroscópico do extrato seco de urucum (*Bixa Orellana L.*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1888-1892, nov./dez. 2008.

ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, Barking, v. 41, p.184-193, 2008.

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

ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, Abingdon, v. 10, n. 4, p. 413-435, 1993.

BACUS, J. Meat fermentation. **Food Technology**, Chicago, v. 38, n. 6, p. 59-63, 1984.

_____. Utilization of microorganisms in meat processing. Letchworth: Research Studies Press, 1986. 170p.

BARBUT, S. Effect of retail lights on acceptability of salami. **Meat Science**, Oxford, v. 66, p. 219-223, 2003.

BERAQUET, N. J. **Embutidos fermentados**: princípios do processamento de embutidos cárneos. Campinas: Centro de Tecnologia de Carnes (CTC-ITAL), 2005.p. 147-159.

BERIAIN, M. J.; PEÑA, M. P.; BELLO, J. A study of the chemical components which characterize Spanish saucisson. **Food Chemistry**, Oxford, v. 48, p. 31-37, 1993.

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

BOTE, C. L.; OLIVARES, A.; FERNÁNDEZ, E.; RAMIREZ, P.; REY, A. Estratégias genéticas y nutricionales em la modificación de la carne. In:_____. **Derivados cárnicos funcionales**: estratégias y perspectivas. Madrid: Fundación Española de Nutrition – FEN. , 2005. p. 55-64. (Serie Informes)

BOZKURT, H.; BAYRAM, M. Colour and textural attributes of sucuk during ripening. **Meat Science**, Oxford, v. 73, n. 2, p. 344-350, 2006.

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

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000. Aprovar os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de copa, de jerked beef, de presunto tipo Parma, de presunto cru, de salame, de salaminho, de salame tipo alemão, de salame tipo calabrés, de salame tipo friolano, de salame tipo napolitano, de salame tipo hamburguês, de salame tipo italiano, de salame tipo milano, de linguiça colonial e pepperoni. **Diário Oficial**, Brasília, Seção 1, p. 1503, ago. 2000.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12**, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, em anexo. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>>>. Acesso em: 30 abr. 2009.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em agosto, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 19 fev.2010.

BRUNA, J. M.; ORDÓÑEZ, J. A.; FERNÁNDEZ, M.; HERRANZ, B.; de la HOZ, L. Microbial and physico-chemical changes during the ripening of dry fermented sausages superficially inoculated with or having added an intracellular cell-free extract of *Penicillium aurantiogriseum*. **Meat Science**, Oxford, v. 59, p. 87-96, 2001.

CAMPAGNOL, P. C. B. **Cultura starter produzida em meio de cultura de plasma suíno e antioxidante natural na elaboração do salame**. 2007. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

CAVENAGHI, A. D. **Uso da associação de culturas *starter* na fabricação do salame tipo italiano**. 1999. 151 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

_____. **Elaboração de embutidos fermentados cozidos com carne de coxa de frango**. 2005. 181 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CAVENAGHI, A. V.; OLIVEIRA, M. N. Influência de algumas características físico-químicas e sensoriais na qualidade de salame tipo italiano fabricado no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 23, n. 263, p. 44-48, jan. 1999.

CHAMBI; H. N. M.; ALVIM I. D.; BARRERA-ARELLANO D.; GROSSO, C. R. F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: production, characterization and release profiles. **Food Research International**, Barking, v. 41, p. 229–236, 2008.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Food Biotechnology**, London, v.18, p.184-190, 2007.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 45, p. 61-84, 2005.

CHR. HANSEN. **Bactoferm F-1**: especificação de produto. Valinhos: Chr. Hansen Ind. e Com, 2008. 2 p.

CICHOSKI; A. J. **Desenvolvimento de paleta suína curada maturada e fermentada com adição de *Staphylococcus xylosus***. 2004.124 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CICHOSKI; A. J.; TERRA, N. N. Lipólise e a qualidade sensorial dos produtos cárneos. **Revista Higiene Alimentar**, Itapetininga, v. 15, n. 85, p. 36-40, jun. 2001.

CIROLINI, A. ***Staphylococcus xylosus* e *Lactococcus lactis* spp *lactis* natives utilizados na elaboração de salame tipo Italiano**. 2008. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

COMI, G.; URSO, R.; IACUMIN, L.; RANTSIOU, K.; CATTANEO, P.; CANTONI, C.; COCOLIN, L. Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. **Meat Science**, Oxford, v. 69, p. 381-392, 2005.

CRYOVAC. **BB494**: incolor, side seal, liso. Sec. vendas: Sealed Air Cryovac, 2007. 2 p.

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

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 136-151, 1988.

DURÁ, M. A.; FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Effect of *Debaryomyces* spp. On the proteolysis of dry-fermented sausages. **Meat Science**, Oxford, v. 68, p. 319-328, 2004.

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

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina. 2001.
<http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html>. Acesso em: 10 fev.2009.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Michwissenschaft**, Kempten, v. 55, p. 496-499, 2000.

_____. Microencapsulation of *L. acidophilus* and *B. lactis* and evaluation of their survival at the pHs values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; HEINEMANN, R. J. B.; PEDROSO, D. L. Developments in probiotic encapsulation. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Wallingford, v. 6, n. 4, p.1-8, 2011.

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

_____. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Food Science & Tecnology**, Zurich, v. 11, p. 201-209, 2001.

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

GARCÍA-ESTEBAN, M.; ANSORENA, D.; ASTIASARÁN, I. Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. **Meat Science**, Oxford, v. 67, p. 57-63, 2004.

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

GØTTERUP, J.; OLSEN, K.; KNØCHEL, S.; TJENER, K.; STAHNKE, L. H.; MØLLER, J. K. S. Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite-and nitrate-reductase activities. **Meat Science**, Oxford, v. 78, n. 4, p. 429-501, Apr. 2008.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004.

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

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, Campinas, v.35, p.151-156, 2004.

GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. **Digestive and Liver Disease**, Rome, v. 38, v. 2, p. S242-S247, 2006.

HERRANZ, B.; FERNÁNDEZ, M.; HIERRO, E.; BRUNA, J. M. ORDÓÑEZ, J. A.; de la HOZ, L. Use of *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763 and α -ketoglutarate to improve the sensory quality of dry fermented sausages. **Meat Science**, Oxford, v. 66, p. 151-163, 2003.

HERRERO, A. M.; ORDÓÑEZ, J. A.; de AVILA, R.; HERRANS, B.; de la HOZ, L.; CAMBERO, M. I. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physic-chemical characteristics. **Meat Science**, Oxford, v. 77, n. 3, p.331-338, Nov. 2007.

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

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

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

HUGHES, M. C.; KERRY, J. P.; ARENDT, E. K.; KENNEALLY, P. M.; McSWEENEY, P. L. H.; O'NEILL, E. E. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. **Meat Science**, Oxford, v. 62, n. 2, p. 205-216, Oct. 2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON ILLUMINATION. Recommendations on Uniform Color Spaces, Color Difference Equations, Psychometric Color Terms. **Bureau Central de la CIE**, Paris, n. 15, Supplement (E-1.3.1), 1978.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

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

KENNEALLY, P. M.; SCHWARZ, G.; FRANSEN, N. G.; ARENDT, E. K. Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages. **Journal of Food Science**, Malden, v. 63, n. 3, p. 538-543, May 1998.

KOREL, F.; ACTON, J. Composition of fermented sausages in the USA retail market. **Fleischwirtschaft International**, Frankfurt, n. 4, p. 35-38, Nov. 2002.

KOTTKE, V.; DAMM, H.; FISCHER, A.; LEUTZ, U. Engineering aspects in fermentation of meat products. **Meat Science**, Oxford, v. 43, n. S, p. S243-S255, 1996.

KRÖCKEL, L. Use of probiotic bacteria in meat products. **Fleischwirtschaft International**, Frankfurt, v. 86, p. 109–113, 2006.

LAHTINEN, S. J.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J.; FORSELL, P.; MYLLÄRINEN, P. Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, p. 500-505, 2007.

LAPPE, R. **Influência da utilização do extrato hidroalcoólico de própolis sobre o desenvolvimento de fungos e características físico-químicas e sensoriais do salame tipo Italiano**. 2004. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

LEAHY, S. C.; HIGGINS, D. G.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **Applied Microbiology**, Washington, v. 98, n. 6, p. 1303-1315, 2005.

LEE, K. T.; LEE, Y. K.; SON, S. K.; CHOI, S. H.; LEE, S. B. Changes in various quality characteristics of short-ripened salami during storage at chilled or room temperature. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, Seoul, v. 29, n. 1, p. 24-33, Feb. 2009. Abstract.

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

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

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. F. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, London, v. 21, p.1-16, 2007.

LIZASCO, G.; CHASCO, J.; BERIAIN, M. J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salsichón, a Spanish dry cured sausage. **Food Microbiology**, London, v. 16, p. 219-228, 1999.

LORENZO, J. M.; MICHINEL, M.; LÓPEZ, M.; CARBALLO, J. Biochemical Characteristics of Two Spanish Traditional Dry-cured Sausage Varieties: Androlla and Botillo. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 13, p. 809-817, 2000.

LÜCKE, F. -K. Review: Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, Oxford, v. 56, n. 2, p. 105-115, Oct. 2000.

MACEDO, R. E. F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. 2005. 193 p.. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

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

MANNING, T. S.; GIBSON, G. R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Rotterdam, v. 18, p. 287-298, 2004.

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

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

MEILGAARD, M., CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4rd. ed. Boca Raton: CRC Press, Florida, 2006.

MERCENIER, A.; PAVAN, S; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: Present knowledge and future prospects, **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 9, p. 175-191, 2003.

MONTEL, M. C.; MASSON, F.; TALON, R. Bacterial role in flavour development. **Meat Science**, Oxford, v. 49, p. 111-123, 1998.

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

NOVELLI, E., ZANARDI, E., GHIRETTI, G. P., CHIZZOLINI, R., CAMPANINI, G.; DAZZI, G., MADARENA, G. Indagine sulla presenza di ossidi del colesterolo nelle carni suine fresche e trasformate. **La Rivista di Scienza dell’Alimentazione**, Roma, v. 26, n. 1, p. 43–49, 1997.

NOVIK, G. I.; SAMARTSEV, A. A.; ASTAPOVICH, N. I.; KAVRUS, M. A.; MIKHALYUK, A. N. Biological activity of probiotic microorganisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 42, p. 166-172, 2006.

OLESEN, P. T.; MEYER, A. S.; STAHNKE, L. H. Generation of flavour compounds in fermented sausages – the influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. **Meat Science**, Oxford, v. 66, p. 675-687, 2004.

PARVEZ, S., MALIK, K. A., AH KANG, S.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 1171–1185, 2006.

PEDROSO, D. L. **Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por spray chilling**. Pirassununga, 2011. 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2011.

PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; SAYAS-BARBERÁ, M. E.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.; ARANDA-CATALÁ, V. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. **Food Research International**, Amsterdam, v. 32, p. 599-607, 1999.

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

PINTO, M. F.; PONSANO, E. H. G.; HEINEMANN, R. J. B. Bactérias envolvidas no processamento de produtos cárneos – uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 35, n.1-2, p. 109-116, 2001.

PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N. P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.

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

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

SANCHEZ-RODRIGUES, M. E. Parametros de color del Jamon Iberico de Bellota D. O. Guijuelo al final del periodo de maduracion. **Alimentaria**, Lisboa, p.33-39, April 2001.

SANTA, O. R. S. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas *starter* para a produção de salame tipo italiano**. 2008. 133 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SANZ, Y.; FLORES, J.; TOLDRA, F.; FERIA, A. Effect of pre-ripening on microbial and chemical changes in dry fermented sausages. **Food Microbiology**, London, v. 14, p. 575-582, 1997.

SCHEID, G. A. **Avaliação sensorial e físico-química de salame tipo Italiano com diferentes concentrações de cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllus*)**. 2001. 94 p. Dissertação (M.S. Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SENOK, A. C., ISMAEEL, A. Y.; BOTTA, G. A. Probiotics: Facts and myths. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 11, p. 958–966, 2005.

SHIMA, M.; MATSUO, T.; YAMASHITA, M.; ADACHI, S. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, p. 281-285, 2009.

SOYER, A.; ERTAS, A. H.; ÜZÜMCÜOĞLU, Ü. Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucukus). **Meat Science**, Oxford, v. 69, p.135-141, 2005.

STAHNKE, L. H. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels – Part I. Chemical and bacteriological data. **Meat Science**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 179-191, 1995.

SUMMO, C.; CAPONIO, F.; PASQUALONE, A. Effect of vacuum-packaging storage on the quality level of ripened sausages. **Meat Science**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 249-254, Oct. 2006.

TAYLOR, A. H. Encapsulation systems and their applications in the flavour industry. **Food Flavouring, Ingredients, Packaging and Processing**, London, n. 5, p. 48, Sept. 1983.

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

TODD, R. D. Microencapsulation and flavor industry. **Flavor Industry**, London, v.1, n. 11, p. 768-771, 1970.

TYÖPPÖNEN, S.; MARKKULA, A.; PETÄJÄ, E.; SUIHKO, M. L.; MATTILA-SANDHOLM T. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. **Food Control**, Guildford, v.14, p.181-185, 2003.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 233-244, 2003.

WANG, F.-S.; JLANG, Y. N.; LIN, S. W. Lipid and cholesterol oxidation in Chinese-style sausage using vacuum and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, Barking, v. 40, n.1, p. 93-101, 1995.

ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; BADIANI, A.; CHIZZOLINI, R. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. **Meat Science**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 7-14, May 2002.

ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; BATTAGLIA, A.; CHIZZOLINI, R. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. **Meat Science**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 415-423, Feb. 2004.

ŽLENDER, B.; GAŠPERLIM, L.; ROGELJ, I.; POLAK, T.; BERČIČ, T. Properties of dry fermented sausages with the addition of probiotic and prebiotic. In: 55th International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST), 2009, Copenhagen. **Proceedings: The 55th International Congress of Meat Science and Technology**. Copenhagen: p. 1491-1495, 2009. Disponível em: <<http://www.icomst2009.dk.kappa.headline.dk/index.php?id=4048>>. Acesso em: 26 out. 2010.

ANEXOS

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, segundo o Conselho Nacional de Saúde.

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Microorganismos probióticos nas formas livre e microencapsulada em salame tipo italiano”.

AUTORES DA PESQUISA: Carmen J. Contreras Castillo e Juliana Nogueira Ruiz

JUSTIFICATIVA: A incorporação de bactérias probióticas aos produtos cárneos representa um grande desafio tecnológico devido à conhecida sensibilidade desses microrganismos ao sal, às especiarias e às demais substâncias utilizadas em sua formulação. Com essa adição, torna-se necessário o uso de microrganismos que resistam ao processo de fermentação da carne e que permaneçam viáveis para sobreviver à passagem pelo estômago e intestino delgado e que exerçam suas ações benéficas ao organismo.

POPULAÇÃO DE ESTUDO: Alunos, funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ/USP e consumidores acostumados ao consumo de salame tipo italiano que se declarem receptivos a experimentar o salame com microrganismos probióticos e manifestem seu consentimento. Esta população deverá apresentar faixa etária entre 20 e 50 anos e será constituída, por comodidade, de alunos que estejam cursando ou já tenham terminado a graduação ou pós-graduação e de funcionários que estejam trabalhando, sem discriminação de cor e sexo, e que se disponibilizem a participar da análise sensorial com hora e data pré-estabelecidos.

METODOLOGIA: Consiste em um experimento com microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* que serão analisados na forma livre e encapsulada e aplicados no salame e comparados com um controle que consiste no embutido isento de probióticos contendo apenas a cultura starter padrão. As análises físico-químicas serão realizadas no laboratório de Química e Processamento de Alimentos, as análises sensoriais no laboratório de Análise Sensorial localizados no LAN e as análises microbiológicas serão realizadas no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP, localizado em Pirassununga-SP.

DESCONFORTOS E RISCOS: Não há riscos previsíveis. Os participantes não sofrerão desconforto, pois somente degustarão o salame após a realização das análises microbiológicas confirmando se o produto está próprio para o consumo conforme a Resolução da ANVISA 12/01/2001. As amostras serão produzidas conforme as boas práticas de manipulação e fabricação, para que não haja risco de contaminação pela manipulação ou por má higienização de equipamentos e/ou utensílios.

BENEFÍCIOS: O trabalho poderá trazer benefícios aos sujeitos da pesquisa, pois gera efeitos à saúde humana, além de seu efeito nutricional por melhorar ou manter o equilíbrio microbiano no intestino.

SUSPENSÃO DA PESQUISA: A pesquisa será suspensa se as amostras apresentarem características organolépticas alteradas ou contagem de microrganismos acima dos padrões estabelecidos pela ANVISA.

TCLE: Todo sujeito da pesquisa receberá uma cópia do TCLE.

Ciente do compromisso assumido na minha colaboração com esta pesquisa, e, pela importância da mesma, subscreve-me a seguir:

Serão entregues 2 (duas) vias de acesso, uma para o pesquisador e outra para o sujeito da pesquisa.

Nome (completo): _____

Assinatura: _____

E-mail: _____ Telefone contato: _____

Caso necessite de informações complementares sobre a presente pesquisa, entrar em contato com:

Pesquisadora Responsável: Carmen J. Contreras Castillo
E-mail: ccastill@esalq.usp.br

Endereço: Avenida Pádua Dias, nº 11; Telefone: (19) 33011714 (residencial) ou (19) 34294150 (profissional)

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da ESALQ
Av. Pádua Dias, 11 - Caixa Postal 9 Piracicaba - São Paulo - CEP: 13418-900
Fone: (0xx19) 3429-4376
Fax: (0xx19) 3429-4225