

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES – URI ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS ENZIMAS B-1,3-GLUCANASE E QUITINASE
COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE DESENVOLVIMENTO DE
FUNGOS DE SUPERFÍCIE DE SALAME**

KARINE CENCE

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI- Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL.

MARÇO DE 2016.

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS ENZIMAS B-1,3-GLUCANASE E QUITINASE
COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE DESENVOLVIMENTO DE
FUNGOS NA SUPERFÍCIE DE SALAME**

Karine Cence

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof^a. Dr^a Geciane Toniazzo Backes
Orientadora

Prof^a. Dr^a Jamile Zeni
Orientadora

Dr^a Cristiane Michele Marchesi
Aurora Alimentos - Erechim

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
URI Erechim

Erechim, Março 2016.

Dedico a minha mãe querida Nair e ao meu pai Waldecir,
A minha irmã Keli e ao meu namorado Maruan.
Pelo grande incentivo e apoio em mais uma conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeramente a Deus pela dádiva da vida e que por sua força, realizo esse sonho.

Agradeço à minha família, meu grande tesouro, em especial a minha querida mãe Nair, pelo suporte emocional, amor, amizade e paciência e pelo incentivo para continuar em busca dos meus sonhos, à minha irmã Keli, pelo grande incentivo em dar continuidade em busca da conclusão deste mestrado, pela paciência e amizade, ao meu pai Waldecir, pelo amor e paciência.

Agradeço ao Maruan Dal Mas, meu namorado e companheiro, esse sim esteve presente na maioria dos dias, dos mais difíceis aos mais felizes. Obrigada por seu amor e incentivo para que eu continuasse esta caminhada.

As minhas orientadoras Prof^{as}. Dr^{as} Geciane Toniazzo e Jamile Zeni, por todos os momentos de compreensão e ajuda, por acreditarem no meu trabalho e pelos ensinamentos ao longo destes dois anos de mestrado.

Ao Prof. Dr. Rogério Luis Cansian por todo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço imensamente à Patrícia dos Santos, bolsista de iniciação científica que esteve presente em todas as etapas do projeto, meus sinceros agradecimentos. Obrigada com carinho pela sua ajuda inestimável para realização deste trabalho.

À Aurora Alimentos pela liberação para estudo para que assim realizasse minha qualificação profissional.

Sou grata a todos que se sentem parte desta conquista e que de alguma forma, seja por seus conselhos, sua ajuda, seu tempo, suas doações, sua compreensão, seu apoio ou sua companhia, foram indispensáveis para realização de mais uma etapa na minha vida acadêmica.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt).

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**AValiação DO EFEITO DAS ENZIMAS β -1,3-GLUCANASE E QUITINASE
COMO ALTERNATIVA NO CONTROLE DE DESENVOLVIMENTO DE
FUNGOS NA SUPERFÍCIE DE SALAME**

Karine Cence

Março, 2016.

Orientadores: Geciane Toniazzo Backes

Jamile Zeni

O desenvolvimento de métodos de controle biológico, como emprego de enzimas, está sendo utilizado como uma alternativa no controle de micro-organismos indesejáveis em alimentos. Durante o processo de maturação do salame, pode ocorrer o desenvolvimento de fungos filamentosos indesejáveis, podendo ocasionar alterações de cor e sabor e ataque ao envoltório, como também representar um problema de saúde pública pelas toxinas que podem produzir. Neste contexto, o presente trabalho avaliou a ação *in vitro* das enzimas comerciais, β -glucanase e quitinase, no controle do crescimento de fungos contaminantes, indesejáveis na fabricação de salame. Para tanto foram isolados 4 fungos filamentosos da superfície de 8 amostras de salame e identificados dois do gênero *Penicillium* e dois do gênero *Aspergillus*. Com estes micro-organismos avaliou-se a ação inibitória do crescimento celular das enzimas nas concentrações de 50, 40, 30 e 20%, através da determinação da concentração inibitória mínima. A concentração de 50% para ambas as enzimas foi a que apresentou maior inibição do crescimento, demonstrando potencial fungicida. Os resultados na análise visual comprovaram que a aspersão da β -glucanase na concentração de 50% e quitinase nas concentrações de 50 e 40% inibem o crescimento dos fungos *Penicillium* sp. (F1), *Aspergillus* sp. (F2) e *Aspergillus* sp. (F4), respectivamente.

Palavras-chave: Enzimas, atividade antifúngica, maturação, salame.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

EVALUATION OF THE EFFECT OF β -1,3-GLUCANASE AND CHITINASE AS ALTERNATIVE IN FUNGI DEVELOPMENT CONTROL IN SALAMI SURFACE

Karine Cence

March, 2016.

Advisors: Geciane Toniazzo Backes
Jamile Zeni

The development of biological control methods such as use of enzymes, is being used as an alternative for controlling undesirable microorganisms in food. During salami maturation process, may develop undesirable filamentous fungi, which can cause color and flavor changes and attack to wrap, but also present a public health problem due to toxin production. In this context, this study evaluates the in vitro effect of commercial enzymes, β -glucanase and chitinase in controlling the growth of fungal contaminants, undesirable in the salami manufacturing. Therefore, we isolated four filamentous fungi of the surface of 8 salami samples and being identified two of the genus *Penicillium* and two *Aspergillus*. With these microorganisms evaluated the inhibitory activity of the enzymes of cell growth at concentrations of 50, 40, 30 and 20%, by determining the minimum inhibitory concentration. The concentration of 50% for both enzymes showed the most growth inhibition, demonstrating potential fungicide. The results of the visual analysis showed that the sprinkling of β -glucanase at a concentration of 50% and chitinase in concentrations of 50% and 40 inhibit the growth of fungi *Penicillium* sp. (F1), *Aspergillus* sp. (F2) and *Aspergillus* sp. (F4) respectively.

Keywords: enzymes, antifungal activity, maturation, salami.

SUMÁRIO

Abstract.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Embutido Carne Fermentado	13
3.2 Salame	14
3.3 Elaboração de Salame	16
3.4 Desenvolvimento dos Fungos	22
3.5 Controle no Desenvolvimento de Fungos	24
3.5.1 β -1,3 glucanases	26
3.5.2 Quitinases.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Enzimas	29
4.2 Isolamento dos Micro-organismos	29
4.3 Identificação dos micro-organismos.....	30
4.4 Efeito Inibitório da β -glucanase e Quitinase na Lise Celular – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)	30
4.5 Análise Visual Discriminativa Pelo Teste De Diferença Do Controle...	31
4.6 Tratamento Estatístico	32
5 RESSULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Isolamento e Identificação dos Micro-organismos	33
5.2 Identificações dos Micro-Organismos por Micro Cultivo.....	34
5.3 Efeito Inibitório da β -glucanase na lise celular	37
5.4 Efeito Inibitório da Quitinase na lise celular.....	44
5.5 Análise Visual.....	49
6 CONCLUSÕES.....	58
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral da elaboração de Salame. (Fonte: TERRA, 2003)	19
Figura 2. Sala de cura. (Fonte: Autor)	22
Figura 3. Modelo da ficha de avaliação de análise visual.....	32
Figura 4. Aspectos das colônias de micro-organismos isolados (a) F1, (b) F2, (c) F3 e (d) F4.	33
Figura 5. Identificação dos fungos filamentosos pela técnica de micro cultivo (a) F1, (b) F2, (c) F3 e (d) F4.	35
Figura 6. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo <i>Penicillium</i> sp. (F1).....	51
Figura 7. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. (F2).	52
Figura 8. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo <i>Penicillium</i> sp.(F3).....	52
Figura 9. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. (F4).	53
Figura 10. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo <i>Penicillium</i> sp. (F1).....	55
Figura 11. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. (F2).	55
Figura 12. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo <i>Penicillium</i> sp.(F3).....	56
Figura 13. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo <i>Aspergillus</i> sp. (F4).	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ação da β -glucanase sobre o crescimento celular do <i>Penicillium</i> sp. (F1) com inoculo na concentração de 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.....	37
Tabela 2. Ação da β -glucanase sobre o crescimento celular do <i>Aspergillus</i> sp. (F2) com inoculo de 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.....	38
Tabela 3. Ação da β -glucanase sobre o crescimento celular <i>Penicillium</i> sp. (F3) com 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.....	40
Tabela 4. Ação da β -glucanase sobre o crescimento celular <i>Aspergillus</i> sp. (F4) com 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.....	42
Tabela 5. Ação da quitinase sobre o crescimento celular do <i>Penicillium</i> sp. (F1) com inoculo na concentração de 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.....	44
Tabela 6. Ação da quitinase sobre o crescimento celular do <i>Aspergillus</i> sp. (F2) com inoculo de 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.....	45
Tabela 7. Ação da quitinase sobre o crescimento celular <i>Penicillium</i> sp. (F3) com 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.....	46
Tabela 8. Ação da quitinase sobre o crescimento celular <i>Aspergillus</i> sp. (F4) com 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.....	48
Tabela 9. Teste de comparação múltipla, análise visual do controle dos fungos F1, F2, F3 e F4 através da aplicação superficial de diferentes concentrações de enzima β -glucanase em relação ao padrão (sem enzima).....	50
Tabela 10. Teste de diferença do controle, análise visual do controle dos fungos F1, F2, F3 e F4 através da aplicação superficial de diferentes concentrações de enzima quitinase em relação ao padrão (sem enzima).	53

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície dos salames durante a maturação é considerado um fator de qualidade que deve complementar mudanças bioquímicas envolvidas na maturação do produto. Muitos destes fungos podem, no entanto, ocasionar alterações de cor e sabor e o ataque ao envoltório, como também representar um problema de saúde pública pelas toxinas que podem produzir (CASTRO et al., 2000). Os efeitos procurados por mofo benéficos em salames são: o sabor típico, mediado por oxidação do lactato, proteólise e degradação de aminoácidos, lipólise, protegendo contra colonizações espontâneas de mofo indesejáveis e bactérias que podem produzir metabólitos secundários altamente tóxicos (LÜCKE, 2000).

No Brasil ainda existem muitas indústrias que utilizam equipamentos e salas de cura que não possibilitam um controle eficaz referente à umidade, temperatura e velocidade de ar. Muitas ainda são de madeira o que dificulta a aplicação de uma metodologia eficaz de limpeza e sanitização do ambiente. Não se pode aplicar um processo de lavagem com água, pois as paredes podem absorvê-la, proporcionando um ambiente úmido, sendo este indesejável, pois poderá dificultar a secagem do salame, bem como favorecendo o crescimento de bolores e leveduras indesejáveis que podem dar origem a toxinas colocando assim em risco a segurança alimentar dos consumidores.

A inexistência de complexos climatizados em diversas empresas processadoras de salames, e o controle não totalmente efetivo das condições ambientais das câmaras climatizadas existentes favorece o desenvolvimento de uma microbiota fúngica indesejável. A constituição dessa microbiota pode apresentar fungos toxigênicos e/ou constituir um problema comercial por descaracterização dos produtos, através de alterações de cor e sabor, ou ataque ao envoltório do embutido (LEISTNER; PITT, 1997).

O desenvolvimento de métodos de controle biológico está sendo utilizado como uma alternativa no controle de doenças ou micro-organismos indesejáveis em alimentos nos últimos anos. Enzimas como as β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases são capazes de hidrolisar

componentes da parede celular de micro-organismos e, por isso, apresentam atividade lítica sobre leveduras e fungos (SELITRENNIKOFF, 2001).

A ação das enzimas, β -1,3-glucanase e quitinase, com atividade antagonista contra patógenos pode variar dependendo das características do micro-organismo (CASTORIA et al., 1997; PATIL et al., 2000; ZHAO et al., 2008); por isso, a aplicação de β -1,3-glucanases e quitinases tem o seu principal papel em retardar ou diminuir o crescimento de fungos patogênicos em alimentos (XU; TIAN, 2008).

Desta forma, as β -glucanases e quitinases podem ser aplicadas no controle de micro-organismos indesejáveis em alimentos, tais como fungos contaminantes na superfície de salames. É neste contexto que se insere a presente proposta, a qual visa avaliar o efeito das enzimas β -glucanases e quitinases como uma alternativa no controle do desenvolvimento de fungos na superfície e salames nas câmaras de maturação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito da aplicação *in vitro* de quitinase e β -glucanase como uma alternativa no controle do desenvolvimento de fungos na superfície de produtos curados.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar os gêneros de fungos contaminantes presentes na superfície de salame;
- Determinar a concentração inibitória mínima das enzimas comerciais β -glucanases e quitinases, sobre os gêneros de fungos isolados;
- Analisar visualmente a ação das enzimas no controle dos micro-organismos isolados cultivados em meio PDA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item constam informações sobre embutido fermentado, salame e elaboração de salame, utilização de condimentos, desenvolvimento e controle de fungos, β -glucanases e quitinases.

3.1 Embutido Carne Fermentado

O desenvolvimento de novos produtos processados tem como função fornecer ao consumidor produtos de paladar variado e adequado, fazendo com que a indústria de produtos cárneos aproveite melhor a popular “carne de segunda”. Os produtos cárneos processados se definem como aqueles em que se modificou alguma característica ou propriedade da carne fresca, visando prolongar a vida comercial desses, por meio da anulação ou atenuação da ação de micro-organismos ou enzimas (MADRUGA; FIOREZE, 2003).

Embutidos fermentados caracterizam-se por baixo teor de umidade, baixa atividade de água e concentração de ácido láctico nas devidas proporções que conferem ao embutido um sabor agradável. No processamento destes produtos é utilizada a combinação de vários métodos de conservação que visam à diminuição de atividade de água, queda de pH, e consequente conservação sem o uso de frio (YAMADA; BERAQUET, 1993).

Os embutidos fermentados são normalmente classificados como secos ou semi-secos, embora alguns possam ser considerados intermediários. Embutidos secos ou do tipo italiano contem de 30 a 40% de umidade, não são defumados ou processados a quente e são consumidos geralmente a quente (JAY, 2005).

Os embutidos cárneos fermentados são aqueles que sofrem uma rápida fermentação inicial com posterior desidratação parcial, embutidos em envoltórios naturais ou artificiais, defumados ou não. Esses produtos dispensam refrigeração e possuem grande estabilidade quando comprados com outros produtos cárneos, obtidos pela combinação de diversos fatores que atuam como obstáculos ao crescimento microbiano indesejável (FROSI, 2002; VANDENDRIESSCHE, 2008). De acordo com Beraquet (2005), os embutidos fermentados são produtos resultantes da fermentação láctica da carne crua triturada e salgada, misturada a gordura em forma de cubos ou triturada,

adicionada de especiarias, embutida e processada em envoltórios naturais ou sintéticos.

3.2 Salame

O salame é um embutido cru, curado, fermentado, maturado e dessecado que poderá ser ou não defumado. É um produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e/ou bovina, adicionado de toucinho, ingredientes, embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais. De acordo com a origem ou o processo de obtenção, a legislação brasileira designa oito tipos de salames, sendo que a diferenciação entre eles está no tipo e na quantidade de matéria-prima, na granulometria da carne e do toucinho e na presença de condimentos (BECKES, 2011).

O salame é um típico produto cárneo fermentado, produzido em larga escala por muitas indústrias na região sul do Brasil. Culturas *starters* são utilizadas no processo de fabricação e a fermentação é controlada (SAWITZKI et al., 2008).

Salame é o resultado de mudanças bioquímicas, microbiológicas, físicas e sensoriais que ocorrem em uma mistura de carne durante a maturação sob condições de temperatura e umidade relativas (UR) definidas (CASABURI et al., 2007). As características físicas e químicas dos salames além de fornecer informações nutricionais também são utilizadas como um dos parâmetros para avaliar a qualidade do produto (DALLA SANTA, 2008).

Internacionalmente, os salames são classificados em dois grandes grupos de acordo com a tecnologia de fabricação e o pH final do produto. Os salames do norte da Europa são elaborados com carne bovina e suína, submetidos a uma fermentação de curta duração e rápido abaixamento de pH. Os salames do sul da Europa ou do Mediterrâneo apresentam em sua formulação, predominantemente carne suína. Sua fermentação é de longa duração, os valores de pH são sempre superiores a 5,0, os quais juntamente com a adição de especiarias, conferem ao produto aroma e sabor envolventes. O Salame Tipo Italiano fabricado no Brasil, enquadra-se no segundo grupo, pois é, predominantemente, obtido a partir de carne suína, maturado por um período aproximado de 30 dias, apresentando aroma e sabor suaves e pH em torno de 5,4 (MACEDO, 2005; TERRA et al., 2003; ZANARDI et al., 2004).

Para Rust (1994) o salame é classificado como linguiça fermentada desidratada e são constituídos por uma mistura de carne magra e gordura cominuídas e ingredientes diversos como sais, açúcares e especiarias. Diferencia-se dos demais embutidos pelo baixo teor de umidade e pela presença de ácido láctico, que confere sabor característico. É um produto de alto valor agregado, cujo consumo tende a aumentar e cujos consumidores são exigentes em termos de qualidade. Nesse contexto está inserido mais particularmente o salame tipo italiano.

De acordo com Pereda et al. (2005) os salames são submetidos a um processo de maturação (secagem) no qual ocorre uma fermentação microbiana que leva ao acúmulo de ácido láctico com a consequente queda do pH, que rege o crescimento microbiano e as complexas reações bioquímicas que ocorrem durante o processo de maturação. O processo de embutir dá forma ao produto cárneo e usam-se tripas de origem natural ou artificial. Assim, a segurança microbiológica e preservação desses produtos são dependentes da associação de vários fatores, incluindo baixa atividade de água, presença de cloreto de sódio e nitrito de sódio, baixo pH da carne e presença de substâncias antimicrobianas adicionadas durante o processamento ou formadas no período de maturação (FREO; REOLON, 2006).

Segundo Forrest et al. (1979) a adição de sais de cura como cloreto de sódio, nitratos e nitritos de sódio ou potássio, tem efeito no produto em relação ao sabor, a coloração, a proteção contra a oxidação lipídica, ao aroma e a proteção antimicrobiana. O cloreto de sódio auxilia no sabor no produto e também na proteção antimicrobiana, diminuindo a quantidade de água disponível no mesmo. O nitrito (NO_2^-) é um componente ativo na obtenção da coloração vermelha e sabor da carne curada, enquanto o nitrato (NO_3^-) é uma fonte de nitrito, em face a ação de bactérias redutoras em pH (potencial de hidrogenização) ácido. O nitrito produz como intermediário o monóxido de nitrogênio (NO) que combinar se com a mioglobina (contida no sarcoplasma das fibras do musculo estriado) e formar mioglobina nitrosa, responsável pela cor vermelha atraente dos produtos cárneos.

Referente à atividade microbiana, Terra (1993) acredita que o nitrito, ao reagir com grupos sulfídricos, produza compostos não metabolizáveis pelos micro-organismos em condições anaeróbicas. Com o uso de nitrito

desaparecem as intoxicações pelo *Clostridium botulinium* geralmente fatais aos consumidores de produtos cárneos.

Segundo Fernández et al. (2001) a fabricação do salame ocorre em duas fases: na primeira, há a fermentação com a ocorrência simultânea, de acidificação e de formação de cor durante sete dias; a segunda fase, consiste na desidratação como decorrência da fermentação, por vinte e três dias. Ao final deste período, o salame tipo italiano deverá apresentar pH entre 5,2 e 5,4 e atividade de água máxima a 0,90, caracterizando a finalização do processo. Ambas as fases ocorrem na câmara de maturação sob condições de umidade relativa, temperatura e velocidade de ar controlada.

O processo fermentativo ocupa a posição de alta relevância na fabricação de salame, pois participa diretamente na geração de cor, sabor, aroma, textura e vida útil (TERRA, 1998). Dentre as diversas características sensoriais do salame, o aroma e a cor constituem fatores decisivos no momento da aquisição do produto por parte do consumidor (TERRA, 2003). O mercado de embutidos cárneos vem apresentando significativa expansão e alta competitividade, pois tais produtos fazem parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores brasileiros.

3.3 Elaboração de Salame

Fernández et al. (2001), conceituam o salame como produto cárneo que consiste da mistura de carne, gordura, sais, agentes de cura, temperos e outros, embutido em tripas, fermentado e desidratado.

A Instrução Normativa N° 22 de 31 de julho de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), alterada pela Instrução Normativa N° 55 de 07/07/2003, fixa a identidade e estabelece as características mínimas de qualidade para os diferentes tipos de salames elaborados. O Anexo XII desta Instrução Normativa nos traz o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame tipo Italiano. Por definição, o Salame tipo Italiano é o “produto cárneo industrializado, elaborado de carnes suínas e bovinas, toucinho, adicionado de ingredientes, moído em granulometria média entre 6 e 9 mm, embutido em envoltórios naturais ou

artificiais, curado, defumado ou não, fermentado, maturado e dessecado por tempo indicado pelo processo de fabricação (BRASIL, 2000).

Conforme a Instrução Normativa, a produção de salame exige como ingredientes obrigatórios carne suína (no mínimo 60%, exceto para o salame tipo hamburguês, onde o teor permitido é de no mínimo 50%), toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio. Ainda como ingredientes opcionais carne bovina, leite em pó, açúcares, maltodextrinas, proteínas lácteas, aditivos intencionas, vinho, condimentos, aromas e especiarias, substancias glaceantes (revestimento externo) e o uso de culturas *starters* como coadjuvantes de tecnologia.

As características físicas e químicas dos salames além de fornecer informações nutricionais também são utilizadas como um dos parâmetros para avaliar a qualidade do produto (DALLA SANTA, 2008). De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade os requisitos máximos e mínimos são: atividade de água máxima de 0,92, umidade máxima de 40%, gordura máxima 35%, proteína mínima 20%, carboidratos totais máximo de 4,0%. (BRASIL, 2000).

Para elaboração do salame são utilizadas carne suína magra de sobrepaleta e paleta, toucinho, sal refinado, especiarias (pimenta branca e preta e chá verde), nitrato e nitrito (substâncias adicionadas para auxiliar na cor, bem como proteger o produto de deteriorações por micro-organismos) e o antioxidante eritorbato de sódio (retarda ou impede a deteriorização de gorduras e a formação de ranço). Para o embutimento se utiliza envoltório artificial.

A elaboração do salame compreende nove fases distintas, conforme a Figura 1 apresenta.

A primeira fase inicia-se com a escolha da matéria-prima, no caso da produção de salame preferem-se as carnes mais intensamente coradas de animais de maior idade. Segundo PARDI et al. (1996) o pH das carnes utilizadas não deverá exceder 5,8, estando preferencialmente situado entre 5,4 e 5,8.

A segunda fase do processo produtivo é a moagem da carne *in natura* em discos com granulometria específica para cada variedade de salame, seguido de fermentação e maturação que pode durar de dias a meses, podendo ser

defumado ou não, com estabilidade microbiológica assegurada por baixas atividade de água e pH (NASSU, 1999). A temperatura das matérias-primas deve ser de no máximo 7°C e o toucinho de no máximo 4°C. Após a trituração da matéria-prima dá-se a adição dos ingredientes e da cultura *starter* em uma misturadeira.

O próximo passo da produção de salame é o embutimento, a massa é embutida em tripa que pode ser natural ou artificial de diâmetro variável. Independente do tipo de tripa deve permitir a saída de água, permitir a penetração da defumação e permitir a retração durante a secagem. Deve-se ter cuidado no embutimento para que a tripa seja embutida adequadamente para evitar defeitos de qualidade (VARNAM, 1998).

Após o embutimento, o produto é levado para fumeiros aonde será realizada a defumação, onde a temperatura máxima deve ser de no máximo 38°C, permanecendo por um período de defumação de 30 horas. O propósito da defumação é aumentar a conservação e modificar a textura, o aspecto, o aroma e o sabor dos alimentos. A defumação possui ação conservante limitada, por este motivo ela deve ser combinada com outros procedimentos de conservação (cura, fermentação, secagem ou aquecimento (MATOS, 2009; PRÄNDL et al., 1994). Logo após a defumação realiza-se a aspersão de 2mL em cada peça de salame de uma solução de *Penicillium nalgiovense*. A aplicação do fungo *Penicillium nalgiovense* na superfície do salame colabora na formação do *flavor* pela formação de compostos voláteis através de um conjunto de enzimas tais como desaminases, transaminases e desidrogenases. Salienta-se o fato de que a deposição externa regula não somente a entrada do ar (rancificação) como da luz, potente catalisador da rancificação do toucinho. Uma perfeita cobertura de fungos sobre a superfície do salame auxilia numa perda de umidade mais homogênea, de forma lenta e progressiva, atuando na diminuição de formação de crosta na superfície dos embutidos (TERRA, 2005).

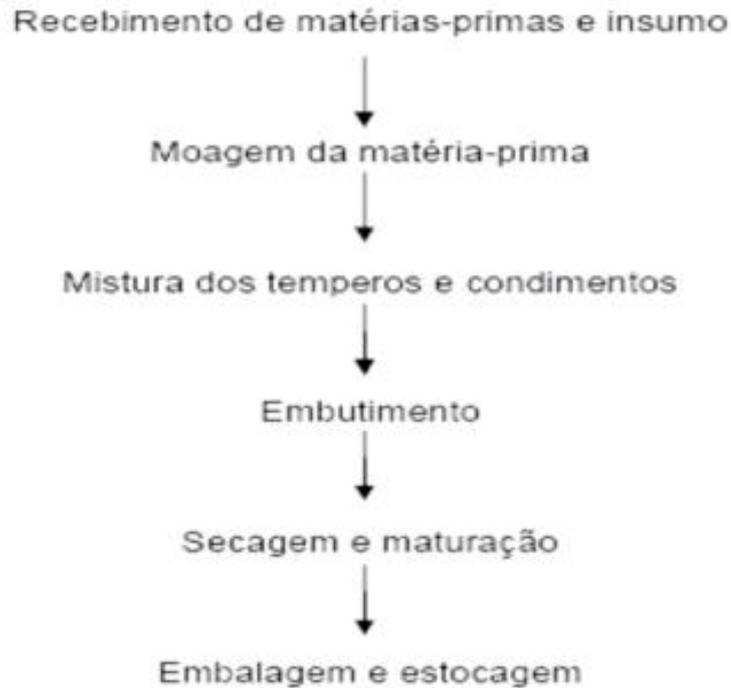


Figura 1. Fluxograma geral da elaboração de Salame. (Fonte: TERRA, 2003)

A fase seguinte à defumação é a secagem e a maturação do salame, que é o processo mais delicado devido à massa estar ainda fresca e com água, permitindo a proliferação de micro-organismos (TERRA, 2003). O produto é levado à câmara de maturação, onde se controla a temperatura e a umidade relativa, sendo estes parâmetros essenciais para se obter uma fermentação adequada.

A fermentação é um dos processos mais antigos utilizados como forma de conservação de alimentos, porém no passado ela era resultado natural da microflora presente na carne e no ambiente. No entanto, hoje se sabe que a fermentação descontrolada pode gerar produtos com baixa qualidade e até mesmo inseguros para o consumo (CIROLINI et al., 2010; ESSID et al., 2007). A fermentação é uma etapa imprescindível para a produção de embutidos fermentados de qualidade, pois nela ocorre uma série de reações bioquímicas, físicas e microbiológicas que estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento das características sensoriais do embutido (TERRA, 1998).

As culturas *starters* são adicionadas aos produtos cárneos fermentados com função de inibir patógenos e aumentar o período de vida útil, sem promover grandes alterações nas características físicas e sensoriais auxiliando a

formação das propriedades organolépticas do produto, tais como cor e textura, além da qualidade higiênica (LÜCKE, 2000). As culturas *starters* atualmente comercializadas são geralmente compostas de mais de um micro-organismo, visando somar suas ações para se obter o efeito desejado no produto final. Os micro-organismos mais utilizados são as bactérias ácido lácticas, incluindo os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, em combinação com a família *Micrococcaceae*, incluindo os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*. Enquanto as bactérias ácido lácticas promovem a segurança do produto por redução do pH através da fermentação, *Staphylococcus coagulase* negativa desenvolvem aroma, sabor e a cor (SIMONOVÁ et al., 2006).

Em determinados embutidos fermentados, se bolores utiliza na superfície do produto, os quais atuam sobre o sabor dos salames devido ao seu arsenal enzimático. Também desempenham ação regulando a desidratação e dificultando a penetração do oxigênio na peça, consequentemente evitando a ocorrência dos indesejáveis processos oxidativos (TERRA, 2003).

Em relação à segurança alimentar a utilização de culturas iniciadoras proporciona o controle de micro-organismos patogênicos devido à competição e ao alto crescimento da flora desejada, além da formação de metabolitos por estas cepas, que também, apresentam atividades antioxidantes e antimicrobianas e, consequentemente, atuam para garantir qualidade e segurança microbiológica do produto fermentado (DROSINOS et al., 2005).

A etapa seguinte é a defumação, que visa aumentar a conservação e modificar a textura, o aspecto, o aroma e o sabor dos alimentos. A defumação possui ação conservante limitada, por este motivo ela deve ser combinada com outros procedimentos de conservação (cura, fermentação, secagem ou aquecimento). As substâncias que constituem a fumaça e possuem ação inibitória sobre os micro-organismos são fundamentalmente o formaldeído, a creosota (mescla de guaiacol, metilguaiacol, cresóis e xilenóis), os fenóis e alguns ácidos como o ácido fórmico e o ácido acético. A ação inibitória da fumaça é mais intensa no local onde se concentram estas substâncias, normalmente a superfície do alimento, assim se considera que a defumação é um método de conservação superficial (MATOS, 2009).

A cura é uma técnica de conservação largamente utilizada desde a antiguidade para prolongar o *shelf life* de produtos alimentares. Atualmente,

processos de cura rápida estão sendo usados na produção de embutidos secos curados contribuindo para indústria cárnea reduzir os custos associados com um processo de cura longo. Entretanto, a cura rápida resulta em perda das características organolépticas típicas do produto final, especialmente ao aroma e sabor (MARCO et al., 2006).

Durante a etapa de cura ocorre o desenvolvimento da cor e também a acidificação, o ideal é que esta etapa aconteça em câmaras climatizadas para ser possível o controle de temperatura e da umidade relativa. Os padrões praticados podem variar bastante dependendo das características do produto que se pretende obter, das condições de infraestrutura disponíveis e da cultura local. Com temperaturas entre 16°C e 18°C, são fabricados produtos de melhor qualidade, sabor e aroma. Entre 24°C e 26°C todo o processo é acelerado, mas causa degradação de gorduras, o que é desfavorável ao sabor do produto. Nas primeiras 24 horas, a umidade relativa é de aproximadamente 95% e em seguida, cai gradativamente para cerca de 80%, para desenvolvimento da cor adequada e da acidificação (MATOS, 2009; YAMADA, 1995).

A fermentação é considerada, por muitos autores, a etapa mais importante do processamento do salame. Durante essa fase, ocorre a produção de ácido láctico e, conseqüentemente, o abaixamento do pH do embutido, que contribui diretamente sobre o sabor levemente picante, a textura típica e a conservação do produto final (GARCIA et al., 2000).

A obtenção do salame ocorre em duas fases: na primeira, há fermentação com a ocorrência simultânea, de acidificação e formação de cor durante sete dias; a segunda fase consiste na desidratação como decorrência da fermentação, por vinte e três dias. Ao final desse período, o salame tipo italiano deverá apresentar pH entre 5,2 e 5,4 e atividade de água igual a 0,87, caracterizando a finalização do processo. Ambas as fases ocorrem na câmara de maturação (Figura 2) sob condições de umidade relativa, temperatura e velocidade de ar controlada (TERRA, 2004).



Figura 2. Sala de cura. (Fonte: Autor)

3.4 Desenvolvimento dos Fungos

O desenvolvimento de fungos filamentosos na superfície dos salames durante a maturação é considerado um fator de qualidade que deve completar mudanças bioquímicas envolvidas na maturação do produto. Muitos destes fungos podem, no entanto, ocasionar alterações de cor e sabor e ataque ao envoltório, como também representar um problema de saúde pública pelas toxinas que podem produzir (CASTRO et al., 2000).

Os bolores vêm sendo utilizados na produção de produtos cárneos fermentados há muitos séculos e tem um papel importante do desenvolvimento do aroma e do sabor destes produtos (COOK, 1995).

O crescimento de fungos ao longo da fermentação em salames ocorre pelas condições do ambiente e a disponibilidade de matéria orgânica. Os fungos preferem ambientes com alta umidade, mas submetidos a um ambiente desidratado esporulam e permanecem como forma de resistência (CIROLINI et al., 2010; MATOS, 2009).

De maneira geral, após os esporos se dispersarem, o desenvolvimento dos fungos depende de sua interação com o oxigênio, umidade, temperatura, pH e atividade de água. A maioria é aeróbia com temperatura ótima de crescimento

entre 20°C e 30°C, umidade relativa superior a 70%, capazes de se adaptar a baixos valores de atividade de água (MATOS, 2009).

O desenvolvimento de bolores na superfície de salames é considerado como fator de qualidade. Por tanto, seu desenvolvimento, dificilmente evitável, pode ser explorado como aspecto de qualidade que venha complementar as mudanças bioquímicas envolvidas na maturação do produto. O controle não totalmente efetivo das condições ambientais nas câmaras climatizadas existentes favorece o crescimento de uma microbiota fúngica indesejável (BRUSTOLIN, 2009). O crescimento de bolores desejáveis previne os efeitos adversos do oxigênio (rancificação e descoloração) e permite uma secagem mais uniforme (SINGH; DINCHO, 1994). Adicionalmente, implica na degradação de ácido láctico, importante fator de *flavour* desse tipo de produto (RÖDEL et al., 1994).

A presença de bolores da superfície de salames pode conduzir os efeitos desejáveis e indesejáveis. Os efeitos procurados são: o sabor típico mediado por oxidação do lactato, proteólise, degradação de aminoácidos, lipólise (GRAZIA et al., 1986; LEISTNER, 1984; LÜCKE, 1998), proteção contra colonizações espontânea de mofo não desejáveis e bactérias (LÜCKE; HECHELMANN, 1987), o retardamento da rancificação e estabilização da cor por atividade de catalases, consumo de oxigênio e proteção contra a luz (BACUS, 1986; BRUNA et al., 2001; LÜCKE; HECHELMANN, 1987), reduzir o risco de desenvolvimento de uma extremidade seca, perda de água uniforme devido a evaporação de água mais lenta (LÜCKE; HECHELMANN, 1987) e facilidade na retirada da tripa (GRAZIA et al., 1986). Os efeitos negativos normalmente são ligados ao crescimento de bolores indesejáveis. O principal efeito desse grupo é a produção de metabolitos secundários altamente tóxicos, micotoxinas que além dos efeitos tóxicos agudos, também são carcinogênicos e podem provocar efeitos degenerativos no fígado (SAMSON et al., 1995).

O recobrimento das peças de embutidos fermentados por fungos é fato normal. Isto ocorre durante a maturação e desidratação com a formação de pequenas colônias que, com o passar do tempo, cobrem integralmente o embutido. Esses fungos pertencem ao gênero *Penicillium* e *Aspergillus* com colorações que vão do branco ao verde e verde azulado e desempenham importante papel na qualidade do embutido cárneo (TERRA, 1998).

O recobrimento pelos fungos auxilia no controle da incidência de luz sobre o embutido e entrada de oxigênio, preservando-o da rancificação. Contudo, se em excesso, poderá conduzir a problemas de aroma e sabor causados pela ação exacerbada de suas enzimas proteolíticas e lipolíticas. Importante salientar que altas temperaturas acompanhadas de altas umidades relativas, complementadas de baixa taxa de agitação do ar ambiental, facilitam o desenvolvimento de fungos. Quando a umidade relativa da câmara climatizada for igual a 80%, inicia-se o aparecimento de fungos de coloração branca apreciados pelo importante papel na qualificação do embutido fermentado.

Estas ações, altamente positivas, são devidas, não somente ao efeito regulador da penetração da luz e do oxigênio no interior da peça cárnea, como também pela ação de suas proteases e lípases, gerando aminoácidos e ácidos graxos de elevada importância no sabor e aroma do produto cárneo (TERRA, 1998).

Contudo, é preciso considerar que à medida que, por descontrole, a umidade relativa da câmara, atinja valores superiores a 80%, o fungo esbranquiçado (útil) cede lugar a fungos de diferentes cores como verde, amarelo e preto. Por conta de práticas inadequadas de sanitização do ambiente ou por descontrole dos parâmetros de umidade e temperatura, os fungos indesejáveis se apresentam e com eles, os efeitos deletérios sobre os salames. Ocasionalmente, outros gêneros como o *Mucor* podem surgir, são indesejáveis e causam danos à tripa. Outros fungos podem formar uma película em torno do embutido impedindo a desidratação e retardando a fabricação do produto o mesmo ocorrendo quando em pré-cura, leveduras em profusão, pelo mesmo processo, prejudicam o desenvolvimento uniforme da cor e cura (TERRA, 1998).

3.5 Controle no Desenvolvimento de Fungos

Os agentes antimicrobianos são aditivos que inibem o crescimento de microorganismos e podem ser de origem sintética ou natural. A Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde define aditivo alimentar como “todo e qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento,

preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento” (BRASIL, 1997).

O mais antigo de todos os agentes conhecidos é o cloreto de sódio. Há também ácidos orgânicos como o acético, benzoico e propanoico que são usados em alimentos com baixo valor de pH. Antimicrobianos naturais consistem cada vez mais uma forma de conservação dos alimentos de forma segura e sem afetar a qualidade dos alimentos (Food Ingredients Brasil, 2010).

Existem alguns métodos para o controle no desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis na superfície de salames, dentre estes, utilização de natamicina, óleos essenciais e enzimas.

De acordo com a Resolução nº 28 da ANVISA (BRASIL, 2001) é permitido o uso de natamicina (pimaricina) (INS 235), como conservador, para o tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos no limite máximo de 1mg/dm², ausente em 5 mm de profundidade.

As plantas condimentares são utilizadas como tempero, realçando o sabor e o aspecto do alimento, podendo apresentar propriedades de conservação. As plantas aromáticas possuem aroma capaz de sensibilizar nosso olfato, destas são extraídos os óleos essenciais, largamente conhecidos pela sua ação terapêutica e farmacológica, também estão sendo estudados quanto ao potencial antimicrobiano, antifúngico, citotóxico, anti-inflamatório e inseticida. Diversas pesquisas apontam nos óleos essenciais a presença de substâncias com tais atividades, prevenindo o início da deterioração e o crescimento de micro-organismos indesejáveis (CASTELLANI et al., 2011; CARVALHO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011; UPNMOOR, 2003).

Muitas vezes a aplicação de óleos essenciais e compostos naturais nos alimentos podem causar modificações sensoriais desagradáveis, porém atualmente diversos conservantes a base de plantas já estão disponíveis e sendo utilizados nos alimentos com sucesso, exemplo disso é o chá verde, muito pesquisado como antioxidante hoje aplicado em formulações alimentícias (BURT, 2004).

Neste contexto, uma alternativa para a inibição do crescimento de fungos e leveduras indesejáveis na superfície de salames é o emprego de enzimas. As enzimas são bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de

modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (DZIEZAK, 1991; COLEN, 2006). Diversas enzimas e suas aplicações vêm sendo descobertas a partir do trabalho conjunto de equipes multidisciplinares da Microbiologia, Bioquímica, Química, Engenharia Bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas. E são decrescentes os custos das enzimas industriais; assim, a utilização de enzimas tende a aumentar continuamente (SANT'ANNA, 2001).

3.5.1 B-1,3 GLUCANASES

As β -1,3-glucanases são produzidas por bactérias (FLEURI; SATO, 2008), leveduras (NEBREDA et al., 1987, DAENEN et al., 2008), e fungos filamentosos (VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS et al., 1998). Muitos fungos filamentosos e leveduriformes são produtores de β -1,3-glucanases extracelulares, produzindo-as constitutivamente ou indutivamente, podendo também ser encontradas associadas à parede celular ou somente no interior da célula (RAPP, 1989; PITSON et al., 1993).

As β -glucanases desempenham um papel importante no processo morfogênico principalmente em leveduras, onde estão relacionadas aos processos de germinação, esporulação e no crescimento celular. Assim como as quitinases e outras hidrolases, as β -glucanases também estão associadas com a quebra de ligações intra e inter poliméricas dos constituintes da parede celular de micro-organismos, bem como com o alongamento destes polímeros através de reações de síntese reversa (BHAGWAT et al., 1996; RAST et al., 2003).

As glucanas são polímeros de açúcar que podem ter centenas ou milhares de unidades monossacarídicas, e diferem entre si pelas ligações glicosídicas que as unem, comprimento de suas cadeias polissacarídicas, e também pelo grau de ramificação, quando presente. Estes polímeros podem ser de origem vegetal, como a celulose, que é uma molécula linear, não ramificada, constituída por unidades de glucose, unidas por ligações glicosídicas do tipo β -

1,4 sendo, portanto, pertencente à classe das β -glucanas. Também existem as glucanas de origem animal, como o glicogênio, que possuem também resíduos de glucose unidos por ligações glicosídicas, porém do tipo α -1,4, com ramificações de resíduos de glucose, interligados por ligações glicosídicas do tipo α -1,6, sendo estas, pertencentes à classe das α -glucanas. Um exemplo de α -glucana vegetal é o amido que é constituído por dois tipos de polímeros, a amilose que contém apenas resíduos de glucose unidos por ligações do tipo α -1,4 e a amilopectina, que possui resíduos de glucose unidos por ligações do tipo α -1,4 e com ramificações de resíduos de glucose, interligados por ligações glicosídicas do tipo α -1,6 (DELMER, 1999; NELSON et al., 2002; ZOBEL, 2006).

A β -1,3 glucana é o componente encontrado em maior quantidade na parede celular de leveduras (KIM et al., 2004), correspondendo juntamente com a β -1,6 glucana, 48 a 60% da estrutura (KLIS, 1994).

As β -1,3 glucanases, proteases líticas e quitinases são capazes de hidrolisar componentes da parede celular de micro-organismos e, por isso, apresentam atividade lítica sobre leveduras e fungos (SELITRENKOFF, 2001).

As β -1,3-glucanases apresentam diversas aplicações desde o uso na caracterização da parede celular microbiana como também na indústria alimentícia, na produção de bebidas como vinho e cerveja, ou também como suplemento alimentar em rações, devido à presença de β -1,3-glucanas (BAUERMEISTER et al., 2010). Uma das principais aplicações biotecnológicas destas enzimas é para o controle biológico.

3.5.2 QUITINASES

Diferentemente da parede celular das leveduras, a parede celular de fungos é composta principalmente por quitina, sendo, portanto, susceptível à ação de enzimas quitinolíticas produzidas por bactérias, fungos, leveduras, plantas, insetos, e crustáceos (FLEURI; SATO, 2005; KUMAR; MAJETI, 2000).

A quitina é um polímero linear composto por resíduos de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) formando ligações $\beta(1\rightarrow4)$. É o segundo polissacarídeo mais abundante do planeta, depois da celulose, estando presente na parede celular de fungos e leveduras e no exoesqueleto de artrópodes. É insolúvel em água e apresenta duas formas cristalinas polimórficas α e β . A α -quitina é

composta por cadeias de GlcNAc paralelas e antiparalelas dispostas alternadamente, a β -quitina é menos comum e possui cadeias arranjadas em paralelo (MINKE; BLACKWELL, 1978; GARDNER; BLACKWELL, 1975; AAM et al., 2010).

Pesquisas relatam a potencial utilização biotecnológica das quitinases em diferentes áreas. As enzimas quitinolíticas apresentam aplicações no ramo da indústria e da agricultura (DAHIYA et al., 2005). Podem ser utilizadas no controle de fungos patogênicos e fitopatogênicos e insetos. Há um crescente interesse na produção de oligossacarídeos de quitina biologicamente ativos através da utilização das quitinases, e estas podem ainda ser aplicadas na preparação de enzimas micolíticas e na formação de protoplastos fúngicos (MAISURIA et al., 2008; PATIL et al., 2000).

As quitinases possuem uma dupla função durante a colonização dos fungos (COLLINGE et al., 1993). Além da capacidade de ataque direto à parede celular dos fungos, estas permitem a libertação de oligo-N-acetil glucosaminas que funcionam como eliciadores na ativação de respostas relacionadas com a defesa em células de plantas (GOHEL et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este item apresenta a descrição da metodologia utilizada na realização das análises *in vitro* e visual da atividade antifúngica das enzimas β -glucanase e quitinase sobre os micro-organismos isolados da superfície de salame.

4.1 Enzimas

As enzimas utilizadas nesse trabalho foram a β -1,3-glucanase (Prozyn) com atividade de 64U/mL obtida por doação e a quitinase (Sigma) adquirida com atividade de 200U/g de sólido.

4.2 Isolamento dos Micro-organismos

Os micro-organismos foram isolados a partir de amostras de salame produzidas por um frigorífico de abate e processamento de suínos localizado na Região do Alto Uruguai do Rio Grande do Sul.

Para coletar as amostras empregou-se a técnica de *swab*. O procedimento constitui na passagem do *swab* comercial (SWAB RÁPIDO 3M (6432-6433)) umedecido em cada peça de salame. Em seguida as amostras obtidas dos *swabs* foram diluídas e alíquotas de 0,1mL foram transferidas para placas contendo meio de Potato Dextrose Agar (PDA), incubadas em estufa (Tecnal, modelo TE - 393/2) a temperatura de 30°C durante sete dias. Após o crescimento de diversos micro-organismos em cada placa, estes foram repicados, um a um, para placas com meio PDA e incubadas novamente a 30°C por 7 dias. Este procedimento foi repetido até o isolamento completo dos micro-organismos. Realizou-se a codificação de cada micro-organismo, para assim facilitar identificações futuras.

Para a manutenção dos micro-organismos isolados, estes foram transferidos para tubos contendo meio PDA inclinado e incubados a 30°C por 48 horas, após foram armazenados a 4°C.

4.3 Identificação dos micro-organismos

Ocorrido o crescimento dos micro-organismos, realizou-se a técnica de micro cultivo em lâmina, utilizando azul de lactofenol-algodão (20g de fenol, 20g de ácido láctico, 40g de glicerina, 0,05g de azul de algodão, 20 mL de água destilada), como corante. No micro cultivo em lâmina, as estruturas permanecem íntegras além de ser utilizado um meio de cultura (ágar batata), que estimula à produção de macro e microconídeos, que na maioria das vezes permitem a identificação do fungo, assim como estimula também, à formação de pigmentos.

Nessa técnica semeou-se o fungo em um cubo de ágar sobre uma lâmina recoberta com uma lamínula esterilizada, e incubada dentro de uma placa de petri contendo 5 mL de água esterilizada para evitar a dessecação do meio de cultura, por 5 dias a 25°C.

A identificação do gênero dos fungos filamentosos foi baseada na morfologia macroscópica das colônias e no estudo das estruturas vegetativas e de frutificação das cepas, seguindo a chave de identificação de gêneros proposta por Barnett; Hunter (1986).

4.4 Efeito Inibitório da β -glucanase e Quitinase na Lise Celular – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM da β -glucanase e da quitinase foi determinada através da técnica de microdiluição. Os experimentos foram realizados em microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo chato, próprios para microdiluição, conforme Adukwu et al. (2012), com modificações. Os fungos foram inoculados separadamente em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e incubados por 30°C durante sete dias. Após o crescimento dos micro-organismos foi efetuada uma suspensão de células em solução de tween 80 a 0,2% em água destilada estéril. Para o inoculo inicial de 10^3 esporos/mL adicionado a cavidade diluiu-se 1mL da solução de 10^4 esporos/mL em 9mL de água destilada estéril e para o inoculo inicial de 10^5 esporos/mL adicionado a cavidade diluiu-se 1mL da solução de 10^6 esporos/mL em 9mL de água destilada estéril.

Foram realizadas diluições da enzima variando-se de 0 (controle negativo) a 50% de enzima (com oito repetições de cada concentração e cada tempo).

Definiu-se uma quantidade fixa para todos os poços, sendo de 260µL (meio e enzima), 130µL de esporos em meio e 130µL das diferentes concentrações de enzima (todas as concentrações de enzima foram diluídas em água estéril e os esporos em meio estéril).

Estabeleceu-se uma amostra controle, contendo 130µL de água estéril com 130µL de enzima com incubação a 30°C/115h. A contagem de cada cavidade foi determinada em leitor de microplacas (EL800 Biotek Instruments, INC.) com λ de 490nm a cada 24h de incubação. Ao termino do período de incubação, a concentração mais baixa de β -glucanase e quitinase que não apresentou crescimento fúngico foi considerada como a CIM.

4.5 Análise Visual Discriminativa Pelo Teste De Diferença Do Controle

A análise visual foi realizada com o objetivo de verificar se existia diferença perceptível entre a amostra padrão (sem enzima) e as amostras com as enzimas nas concentrações citadas no item anterior.

A análise visual foi realizada pelo teste de diferença do controle (Dunnett) (QUEIROZ; TREPTOW, 2006). A característica avaliada foi à coloração dos fungos inoculados em meio PDA (Potato Dextrose Agar) a 30°C/24h em relação a uma amostra padrão.

Participaram da avaliação visual 30 julgadores não treinados, com idade variando entre 22 e 50 anos, de ambos os sexos.

Os testes foram realizados individualmente, com luz branca, por meio da comparação das placas com as diferentes concentrações de enzima (50, 40, 30, 20 e 0% (igual ao padrão) e cetoconazol como controle negativo, apresentou-se uma amostra padrão especificada com a letra P e cinco amostras codificadas com 3 dígitos de números aleatórios (uma amostra de cada diluição de enzima). Os julgadores foram solicitados a observar atentamente as placas de Petri com as amostras, comparando-as com o padrão (P), sem controle dos fungos, e avaliando o grau de diferença entre o padrão e as amostras codificadas, usando uma escala mista estruturada de 8 pontos, variando de nenhum crescimento (nota 0) a igual ao padrão (nota 8)

em relação a presença visual de fungo. A Figura 3 mostra a ficha de avaliação distribuída aos julgadores.

Ficha de Avaliação

Nome: _____ Data: ___/___/___

Você está recebendo uma amostra padrão (P) e cinco amostras codificadas. Compare as amostras codificadas com a amostra padrão **em relação à coloração dos fungos**. Escreva o código da amostra e marque com "x" o quadro que melhor descreve sua percepção.

Código da amostra					
0 Igual ao Padrão					
1					
2 Pequena alteração da cor em relação ao padrão					
3					
4 Moderada alteração da cor em relação ao padrão					
5					
6 Grande alteração da cor em relação ao padrão					
7					
8 Muitíssima alteração da cor em relação ao padrão					
9					

Figura 3. Modelo da ficha de avaliação de análise visual.

4.6 Tratamento Estatístico

A análise estatística de comparação de médias para avaliar o efeito antifúngico dos dados das análises *in vitro*, realizou-se através do Teste de Tukey com 95% de confiança, utilizando o *software* STATISTICA versão 8.0 (Statsoft Inc, USA).

Os resultados da análise sensorial visual foram avaliados através do teste de diferença do controle (Dunnett com 95% de confiança), comparando-se a amostra padrão (P) com os demais tratamentos (QUEIROZ; TREPTOW, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item estão descritos os resultados obtidos através das análises realizadas, bem como a discussão dos mesmos através da comparação com outras pesquisas.

5.1 Isolamento e Identificação dos Micro-organismos

Foram isolados quatro micro-organismos, procedentes da superfície de oito amostras de salame tipo Italiano, codificados como F1, F2, F3 e F4. Por observação em microscópio ótico e meio seletivo pode-se verificar que foram isolados quatro fungos filamentosos, sendo que três apresentaram coloração e outra apresentou uma coloração branca, conforme mostra a Figura 4.

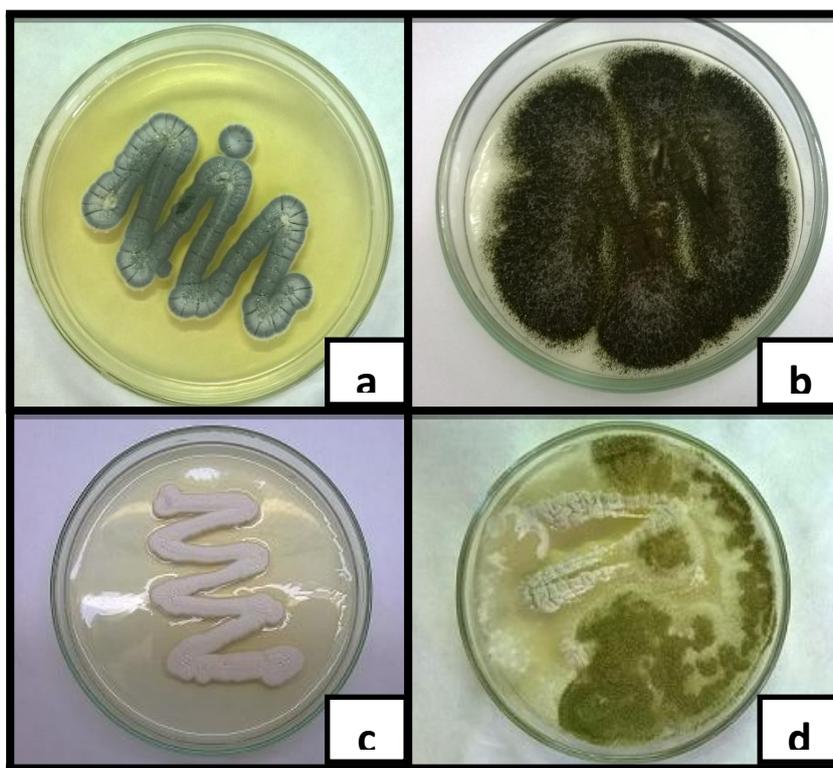


Figura 4. Aspectos das colônias de micro-organismos isolados (a) F1, (b) F2, (c) F3 e (d) F4.

Os produtos tais como o salame, que são curados por nitrato, necessitam de uma determinada microbiota redutora de nitrato. Os micro-organismos nitrato redutores mais importantes nos produtos cárneos são os *Micrococcos*. Também exercem papel importante os *Streptococos* do grupo sorológico D, os *Lactobacilos* e algumas estreptobactérias atípicas como *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Esses micro-organismos contribuem através da produção de ácidos a partir dos hidratos de carbono durante a cura, fundamentalmente o ácido láctico. Assim, além do efeito bactericida do nitrito, também contribuem criando um meio mais inóspito para o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes (MATOS, 2009).

Segundo Cirolini et al. (2010); Matos, (2009) o desenvolvimento desses fungos com diferentes colorações está relacionado à umidade relativa não estar controlada e atingindo valores superiores a 80%. As condições do ambiente e a disponibilidade de matéria orgânica acarretam o seu crescimento. Os fungos preferem ambientes com alta umidade, mas submetidos a um ambiente desidratado esporulam e permanecem como forma de resistência.

Os fungos apresentam colorações como verde, azul, amarelo e preto. Onde o verde e o azul são preocupantes, pois alteraram sabor, no entanto os amarelos e pretos são completamente indesejáveis, sendo que o de coloração preta causa o aparecimento de orifícios na tripa, já o fungo amarelo retarda o tempo de cura por formar uma película ao redor do embutido, dificultando a desidratação (MATOS, 2009; TERRA, 1998).

Estes fungos podem produzir metabólitos secundários tóxicos, além de produzir coloração verde, marrom ou pontos pretos que não são aceitos pela maioria dos consumidores e também podem ter impacto negativo no sabor ou simplesmente retardar o tempo de cura (SAGGIORATO, 2012; SAMSON et al., 1995).

5.2 Identificações dos Micro-Organismos por Micro Cultivo

Através da técnica de micro cultivo foi possível identificar os fungos F4 e F2 como *Aspergillus* sp. Os fungos F1 e F3 foram identificados como *Penicillium* sp., sendo que o fungo de coloração branca provavelmente seja o *Penicillium nalgiovense*, pois este é aspergido no produto na indústria onde foram

realizadas as coletas das amostras. A Figura 5 apresenta os fungos filamentosos identificados pela técnica de micro cultivo.

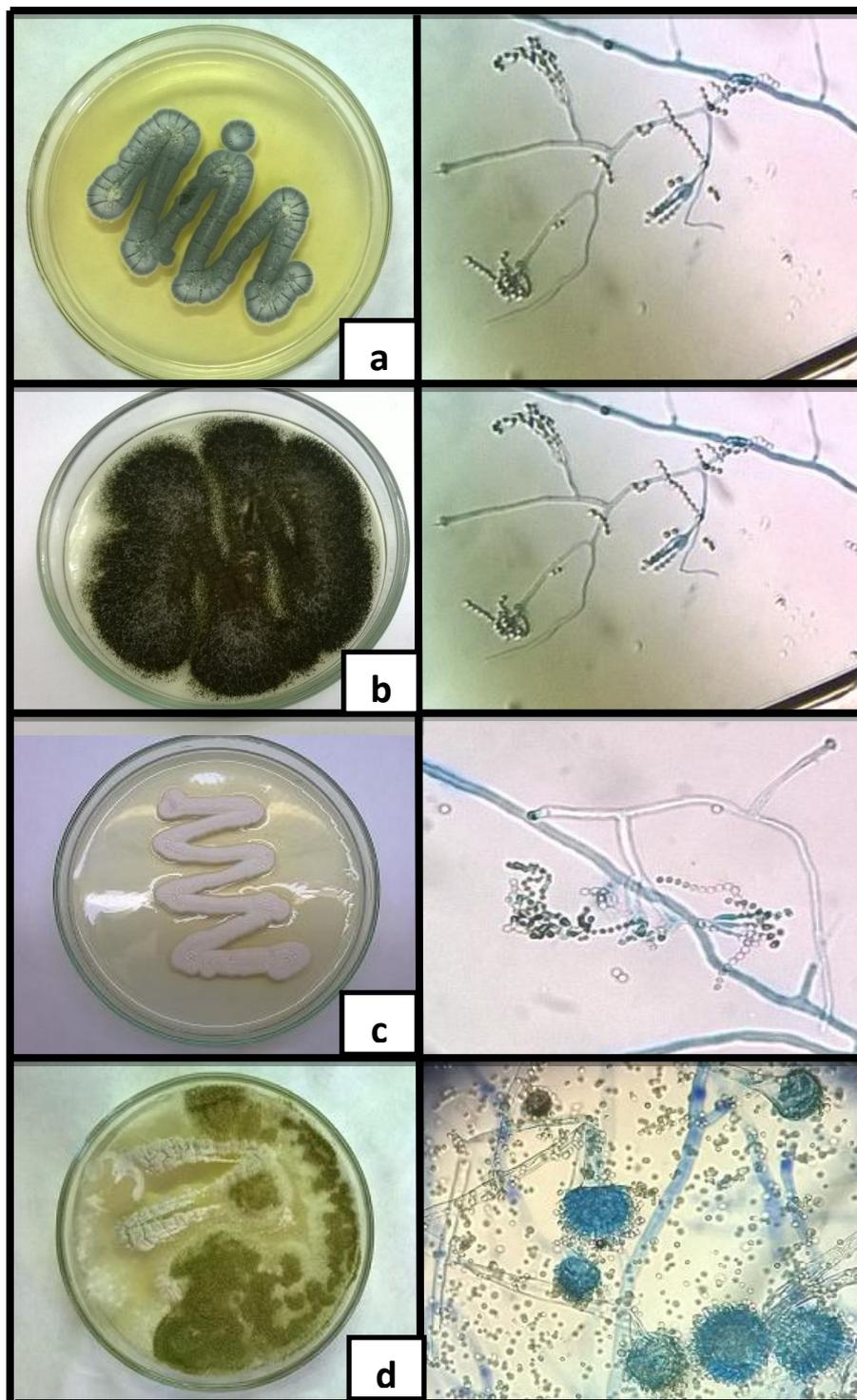


Figura 5. Identificação dos fungos filamentosos pela técnica de micro cultivo (a) F1, (b) F2, (c) F3 e (d) F4.

Os mofos brancos ou cinza são, principalmente, representantes do gênero *Penicillium* e, algumas vezes, de *Scopulariopsis*. Os mofos verdes são também *Penicillium* ou *Aspergillus*. As manchas marrons ou pretas são causadas por *Cladosporium*, *Alternaria* ou *Aspergillus* (LEISTNER; AYRES, 1967). Além disso, algumas espécies de *Penicillium* (*P. stoloniferum*) têm sido identificadas como causadoras de escurecimento em peças de salame (DRAGONI et al., 1986). Como a microbiota natural das câmaras de maturação de salames é formada predominantemente de espécies de *Penicillium*, vem sendo estudada atualmente, a capacidade de estas espécies produzirem micotoxinas (ANDERSEN, 1995; LEISTNER; PITT, 1997). Estas, mesmo ingeridas em pequenas concentrações inaladas ou absorvidas pela pele podem causar: problemas genotóxicos, carcinogênicos, teratogênicos e imunotóxicos (BENNET; KLICH, 2003; SILVA et al., 2010).

Segundo Andersen (1995) e Bremmelgaard (1998), fungos verdes podem produzir manchas pretas ou marrons em salames que não são aceitas pelos consumidores, promovendo impacto negativo no sabor, além de estarem associados à produção de penicilina que podem promover alergias se estiverem em grande quantidade.

Rojas et al. (1991), relata que o *Aspergillus flavus*, também é muito frequente em presuntos. Este fato acontece quando há um aumento da temperatura com o tempo de secagem na sala de processamento, o que pode favorecer o crescimento dos *Aspergillus*.

5.3 Efeito Inibitório da β -glucanase na lise celular

A Tabela 1 apresenta os resultados do efeito inibitório da β -glucanase sobre o crescimento celular do *Penicillium* sp. (F1) inoculado nas concentrações iniciais de 10^5 e 10^3 esporos/mL.

Tabela 1. Ação da β -glucanase sobre o crescimento celular do *Penicillium* sp. (F1) com inoculo na concentração de 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
10^5 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{aC} ± 0,01	<0,01 ^{dC} ± 0,01	<0,01 ^{dC} ± 0,01	0,05 ^{cB} ± 0,02	0,12 ^{cA} ± 0,03
40%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,06 ^{cC} ± 0,01	0,24 ^{cB} ± 0,02	0,32 ^{bB} ± 0,06	0,42 ^{bA} ± 0,05
30%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,10 ^{bC} ± 0,01	0,30 ^{bB} ± 0,02	0,36 ^{bB} ± 0,02	0,55 ^{bA} ± 0,04
20%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,12 ^{bD} ± 0,02	0,37 ^{aC} ± 0,02	1,53 ^{aB} ± 0,04	1,99 ^{aA} ± 0,04
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,17 ^{aD} ± 0,02	0,40 ^{aC} ± 0,01	1,58 ^{aB} ± 0,01	1,82 ^{aA} ± 0,03
10^3 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{aC} ± 0,01	<0,01 ^{dC} ± 0,01	<0,01 ^{dC} ± 0,01	0,13 ^{dB} ± 0,01	0,24 ^{dA} ± 0,02
40%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,04 ^{cD} ± 0,01	0,21 ^{cC} ± 0,01	0,42 ^{cB} ± 0,01	0,92 ^{cA} ± 0,06
30%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,12 ^{bD} ± 0,01	0,36 ^{bC} ± 0,02	1,00 ^{bB} ± 0,01	1,14 ^{bA} ± 0,05
20%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,15 ^{aD} ± 0,01	0,46 ^{aC} ± 0,03	1,13 ^{aB} ± 0,09	1,41 ^{aA} ± 0,08
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,16 ^{aD} ± 0,01	0,52 ^{aC} ± 0,05	1,26 ^{aB} ± 0,07	1,51 ^{aA} ± 0,04

* Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Observa-se que as duas concentrações de inoculo (10^5 e 10^3 esporos/mL) apresentaram comportamentos semelhantes, indicando que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações em 24h de controle do crescimento, porém nos demais tempos houve diferença significativa. Verificou-se que para a concentração de 50% de enzima apresentou inibição total do crescimento até às 72 horas, com posterior crescimento do fungo, sendo este

menor que o controle (0% de enzima). As concentrações de 40 e 30% de enzima retardam o crescimento quando comparadas ao controle independente da concentração de inóculo empregada, durante o período de tempo estudado. Já a concentração de 20% não foi capaz de inibir o crescimento celular, apresentando um comportamento semelhante ao ensaio controle.

Os resultados do efeito inibitório da β -glucanase sobre o crescimento celular do *Aspergillus* sp. (F2) empregando o inóculo de 10^5 e 10^3 esporos/mL encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Ação da β -glucanase sobre o crescimento celular do *Aspergillus* sp. (F2) com inóculo de 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
10^5 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{ab} ± 0,01	<0,01 ^{cb} ± 0,01	<0,01 ^{eb} ± 0,01	0,13 ^{da} ± 0,01	0,14 ^{ea} ± 0,02
40%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{cd} ± 0,01	0,09 ^{dc} ± 0,02	0,24 ^{cb} ± 0,02	0,33 ^{da} ± 0,01
30%	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,06 ^{bd} ± 0,03	0,20 ^{cc} ± 0,04	0,60 ^{bb} ± 0,02	0,91 ^{ca} ± 0,03
20%	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,07 ^{bd} ± 0,01	0,35 ^{bc} ± 0,05	0,99 ^{ab} ± 0,06	1,11 ^{aa} ± 0,01
0	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,12 ^{ac} ± 0,02	0,47 ^{ab} ± 0,03	1,04 ^{aa} ± 0,05	1,02 ^{ba} ± 0,06
10^3 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{ac} ± 0,01	<0,01 ^{bc} ± 0,01	<0,01 ^{cc} ± 0,01	0,07 ^{eb} ± 0,02	0,17 ^{ca} ± 0,01
40%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{bd} ± 0,01	0,05 ^{bc} ± 0,02	0,29 ^{db} ± 0,05	0,48 ^{ba} ± 0,07
30%	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,11 ^{ad} ± 0,02	0,34 ^{ac} ± 0,04	0,78 ^{cb} ± 0,02	1,01 ^{aa} ± 0,01
20%	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,12 ^{ad} ± 0,05	0,35 ^{ac} ± 0,02	0,84 ^{bb} ± 0,01	1,00 ^{aa} ± 0,02
0	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,12 ^{ac} ± 0,01	0,39 ^{ab} ± 0,02	1,00 ^{aa} ± 0,02	0,97 ^{aa} ± 0,01

* Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Verifica-se que as concentrações de inóculo (10^5 e 10^3 esporos/mL) do micro-organismo *Aspergillus* sp. (F2) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações durante 24h de controle do crescimento, assim como o observado para o micro-organismo *Penicillium* sp. (F1).

Observou-se que as concentrações de 20% de enzima não foram capazes de inibir o crescimento fúngico nos tempos estudados, apresentando um comportamento similar ao controle (0% de enzima). Na concentração de 30%, para o inoculo de 10^3 esporos/mL, verificou-se o mesmo comportamento que observado na concentração de 20%. Já na concentração de 30% de enzima para o inoculo de 10^5 esporos/mL observou-se um crescimento baixo, porém constante durante todo o período avaliado apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tempos e do controle. A concentração de 40% de enzima teve efeito fungistático parcial até às 72 horas, havendo um crescimento nas horas seguintes, para ambos inoculos. Já a concentração de 50% de enzima inibiu totalmente o crescimento celular até às 72 horas, com posterior crescimento, porém em menor quantidade quando comparado ao controle (0% de enzima).

A Tabela 3 refere-se aos resultados do efeito inibitório da β -glucanase sobre o crescimento celular do micro-organismo isolado e codificado como F3 e identificado como *Penicillium* sp empregando inoculo de 10^5 e 10^3 esporos/mL.

Tabela 3. Ação da β -glucanase sobre o crescimento celular *Penicillium* sp. (F3) com 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
10^5 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{aC} ± 0,01	<0,01 ^{bC} ± 0,01	0,04 ^{eC} ± 0,02	0,19 ^{dB} ± 0,01	0,25 ^{bA} ± 0,01
40%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,02 ^{bD} ± 0,02	0,21 ^{dC} ± 0,01	0,46 ^{cB} ± 0,04	0,57 ^{bA} ± 0,02
30%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,07 ^{aD} ± 0,01	0,26 ^{cC} ± 0,01	0,73 ^{bB} ± 0,08	1,25 ^{aA} ± 0,02
20%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,08 ^{aD} ± 0,02	0,37 ^{bC} ± 0,02	0,99 ^{aB} ± 0,03	1,26 ^{aA} ± 0,01
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,08 ^{aD} ± 0,03	0,50 ^{aC} ± 0,08	0,97 ^{aB} ± 0,01	1,26 ^{aA} ± 0,05
10^3 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{aC} ± 0,01	<0,01 ^{bC} ± 0,01	0,03 ^{dC} ± 0,01	0,16 ^{dB} ± 0,02	0,23 ^{dA} ± 0,02
40%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	<0,01 ^{bD} ± 0,01	0,14 ^{cC} ± 0,01	0,37 ^{cB} ± 0,07	0,57 ^{cA} ± 0,02
30%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,03 ^{bD} ± 0,02	0,27 ^{bC} ± 0,01	0,85 ^{bB} ± 0,04	1,13 ^{bA} ± 0,08
20%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,22 ^{aC} ± 0,02	0,51 ^{aB} ± 0,02	1,16 ^{aA} ± 0,02	1,13 ^{bA} ± 0,02
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,19 ^{aD} ± 0,01	0,55 ^{aC} ± 0,02	1,13 ^{aB} ± 0,01	1,25 ^{aA} ± 0,02

* Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Observa-se que a concentração de 50% de enzima apresentou uma inibição total do crescimento até às 48 horas, ocorrendo um pequeno crescimento nas horas seguintes, sendo em menor quantidade do que a do controle (0% de enzima). Comportamento similar foi observado para a concentração de 40% de enzima, porém após as 48 horas o crescimento foi mais acentuado diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) para os dois inoculos utilizados. Já para a concentração de 30% de enzima observou-se para a concentração inicial de 10^3 esporos/mL que a concentração de enzima retardou o crescimento até às

48 horas, havendo em seguida um crescimento celular, resultado semelhante apresentado para a concentração 10^5 esporos/mL para esta mesma concentração de enzima, mesmo assim inibindo o crescimento celular em relação ao controle. A concentração de 20% não foi capaz de inibir o crescimento celular, mostrando um comportamento idêntico ao controle.

O *Penicillium* sp. codificado como (F3), que apresenta coloração branca, possivelmente seja o *Penicillium nalgovense*, o qual é aspergido na superfície do salame pela indústria. Este micro-organismo apresentou comportamento diferente aos demais, se mostrando mais resistente à ação da enzima β -glucanase, o que favoreceria o processo tecnológico da produção de salames.

Ao analisar a Tabela 4, que apresenta os resultados do efeito inibitório da β -glucanase sobre o crescimento celular do micro-organismo isolado e codificado como F4 e identificado como *Aspergillus* sp. empregando inoculo de 10^5 e 10^3 esporos/mL, respectivamente, pode-se verificar que as concentrações de 20% a 30% não foram capazes de inibir o crescimento fúngico nos tempos avaliados, exceto para 24 horas, com comportamento semelhante ao crescimento sem aplicação da enzima (0%). As concentrações de 40 e 50% de enzima retardaram o crescimento até 72 e 48 horas para a o inoculo de 10^5 e 10^3 esporos/mL, respectivamente, com crescimento celular nas horas subsequentes, porém diferente estatisticamente do controle ($p < 0,05$).

Tabela 4. Ação da β -glucanase sobre o crescimento celular *Aspergillus* sp. (F4) com 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
10^5 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{ab} ± 0,01	<0,01 ^{db} ± 0,01	<0,01 ^{db} ± 0,01	0,13 ^{eA} ± 0,01	0,16 ^{eA} ± 0,03
40%	<0,01 ^{ac} ± 0,01	<0,01 ^{dc} ± 0,01	<0,01 ^{dc} ± 0,01	0,34 ^{dB} ± 0,02	0,58 ^{dA} ± 0,02
30%	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,04 ^{cd} ± 0,01	0,35 ^{cc} ± 0,01	0,84 ^{cb} ± 0,02	1,01 ^{cA} ± 0,03
20%	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,08 ^{bd} ± 0,01	0,42 ^{bc} ± 0,02	0,90 ^{bb} ± 0,02	1,10 ^{bA} ± 0,02
0	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,19 ^{ac} ± 0,01	0,58 ^{ab} ± 0,03	1,20 ^{aA} ± 0,02	1,17 ^{aA} ± 0,03
10^3 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{bd} ± 0,01	0,06 ^{cc} ± 0,02	0,20 ^{eb} ± 0,01	0,33 ^{eA} ± 0,03
40%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{bd} ± 0,01	0,20 ^{bc} ± 0,01	0,37 ^{db} ± 0,02	0,51 ^{dA} ± 0,07
30%	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,11 ^{ad} ± 0,02	0,35 ^{ac} ± 0,01	0,46 ^{cb} ± 0,03	0,83 ^{cA} ± 0,07
20%	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,14 ^{ad} ± 0,09	0,38 ^{ac} ± 0,02	0,60 ^{bb} ± 0,08	0,96 ^{bA} ± 0,02
0	<0,01 ^{ae} ± 0,01	0,17 ^{ad} ± 0,08	0,33 ^{ac} ± 0,04	0,88 ^{ab} ± 0,09	1,26 ^{aA} ± 0,01

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Ao analisar as Tabelas 1 a 4, verificou-se que a concentração de 50% da enzima β -glucanase foi a que apresentou melhor controle do crescimento fúngico para os micro-organismos isolados da superfície de salame. Existem diversos trabalhos na literatura demonstrando a eficácia da β -1,3 glucanase na lise de parede celular de leveduras, mas poucos demonstrando resultados em fungos filamentosos em alimentos, a maioria relacionados a fungos fitopatogênicos. El-Katatny et al. (2000) analisaram o controle do fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii* utilizando a β -glucanase e quitinase produzidas por *Trichoderma hanzianum*, onde relatam a inibição do *S. rolfsii* com as preparações de enzima acima de 61,8%.

β -1,3-glucanases tem sido estudada para conceber conhecimento sobre a forma de ação dessa enzima em *Trichoderma harzianum* (BENÍTEZ et al., 2004). Estudos realizados com outros micro-organismos demonstraram a

capacidade dessa enzima em degradar β -1,3-glucana presente na estrutura de proteção de leveduras (BLATTEL et al., 2011).

As β -1,3 glucanases são relatadas como inibidoras do crescimento fúngico (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999), pois hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, composto que juntamente com a quitina são os principais componentes da parede celular dos fungos (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993).

Guilloux-Benatier et al. (2000) estudaram a atividade de lise da β -1,3 glucanase produzida pela bactéria *Oenococcus oeni* sobre células de *S. cerevisiae* em diferentes fases de crescimento. Os autores verificaram que a enzima foi capaz de lisar células viáveis e mortas da levedura, sendo que as células nas fases de crescimento exponencial e na fase estacionária foram lisadas com maior facilidade. Neste estudo a β -1,3 glucanase da linhagem de *C. cellulans* 191 apresentou maior lise de *S. cerevisiae* KL-88, na fase exponencial de crescimento (10 h de crescimento estático). O resultado também indica que a parede celular da levedura está em constante mudança, e por isso pode estar mais ou menos susceptível à lise enzimática quando suas células são obtidas em diferentes condições de crescimento. Jose et al. (2014) para obter a extração de DNA fúngico, isolou a β -1,3 glucanase produzida por *Pseudomonas aeruginosa*. A β -glucanase apresentou ótima atividade lítica em diversos fungos e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*.

5.4 Efeito Inibitório da Quitinase na lise celular

A Tabela 5 apresenta os resultados do efeito inibitório da quitinase sobre o crescimento celular do *Penicillium* sp. (F1) inoculado nas concentrações iniciais de 10^5 e 10^3 esporos/mL, respectivamente.

Tabela 5. Ação da quitinase sobre o crescimento celular do *Penicillium* sp. (F1) com inoculo na concentração de 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
10^5 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,14 ^{bD} ± 0,01	0,37 ^{bC} ± 0,06	0,57 ^{dB} ± 0,06	0,76 ^{CA} ± 0,09
40%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,17 ^{aD} ± 0,01	0,42 ^{bC} ± 0,01	0,58 ^{dB} ± 0,04	0,86 ^{CA} ± 0,05
30%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,19 ^{aD} ± 0,02	0,44 ^{bC} ± 0,02	0,66 ^{CB} ± 0,01	0,87 ^{CA} ± 0,02
20%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,19 ^{aD} ± 0,01	0,45 ^{abC} ± 0,01	1,06 ^{BB} ± 0,02	1,21 ^{BA} ± 0,02
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,18 ^{aD} ± 0,02	0,52 ^{aC} ± 0,06	1,17 ^{AB} ± 0,02	1,43 ^{AA} ± 0,02
10^3 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,04 ^{bD} ± 0,06	0,17 ^{cC} ± 0,06	0,49 ^{CB} ± 0,04	1,06 ^{DA} ± 0,01
40%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,05 ^{bD} ± 0,01	0,19 ^{CC} ± 0,02	0,51 ^{bcB} ± 0,06	1,14 ^{CA} ± 0,01
30%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,06 ^{bD} ± 0,02	0,19 ^{CC} ± 0,03	0,53 ^{bcB} ± 0,06	1,34 ^{BA} ± 0,04
20%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,06 ^{bD} ± 0,02	0,25 ^{bC} ± 0,01	0,62 ^{BB} ± 0,05	1,36 ^{BA} ± 0,02
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,19 ^{aD} ± 0,01	0,48 ^{aC} ± 0,03	1,15 ^{AB} ± 0,04	1,59 ^{AA} ± 0,02

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Observa-se que as duas concentrações de inoculo (10^5 e 10^3 esporos/mL) apresentaram comportamentos semelhantes, sem crescimento microbiano, indicando não haver diferença significativa ($p < 0,05$) em 24 horas de controle, porém nos demais tempos observou-se diferença significativa para todas as concentrações de enzimas estudadas. Ao analisar a ação da quitinase sobre o micro-organismo, *Penicillium* sp. (F1), inoculado nas diferentes concentrações, observou-se que com 10^3 esporos/mL a enzima teve uma ação mais eficaz no

controle do crescimento microbiano, apresentando diferença estatística entre as concentrações de enzima avaliadas durante as 115h, ao comparar com a amostra sem enzima. Isto se deve, possivelmente pela menor quantidade de micro-organismos nesta condição de estudo.

Os resultados do efeito inibitório da quitinase sobre o crescimento celular do *Aspergillus* sp. (F2) empregando inoculo de 10^5 e 10^3 esporos/mL encontram-se na Tabela 6

Tabela 6. Ação da quitinase sobre o crescimento celular do *Aspergillus* sp. (F2) com inoculo de 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
10^5 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,37 ^{bC} ± 0,05	0,81 ^{cB} ± 0,02	0,58 ^{dA} ± 0,09	0,67 ^{cA} ± 0,08
40%	<0,01 ^{aC} ± 0,01	0,40 ^{bB} ± 0,03	1,10 ^{bA} ± 0,06	0,99 ^{cA} ± 0,05	1,03 ^{bA} ± 0,09
30%	<0,01 ^{aC} ± 0,01	0,42 ^{bB} ± 0,02	1,09 ^{bA} ± 0,01	1,05 ^{bcA} ± 0,06	1,11 ^{bA} ± 0,05
20%	<0,01 ^{aC} ± 0,01	0,52 ^{aB} ± 0,04	1,11 ^{bA} ± 0,02	1,14 ^{bA} ± 0,03	1,18 ^{abA} ± 0,06
0	<0,01 ^{aC} ± 0,01	0,57 ^{aB} ± 0,01	1,23 ^{aA} ± 0,01	1,27 ^{aA} ± 0,05	1,24 ^{aA} ± 0,03
10^3 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,12 ^{cC} ± 0,01	0,51 ^{dB} ± 0,09	0,92 ^{cA} ± 0,07	1,08 ^{bA} ± 0,09
40%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,12 ^{cD} ± 0,01	0,65 ^{dC} ± 0,06	0,95 ^{cB} ± 0,02	1,08 ^{bA} ± 0,09
30%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,13 ^{bcC} ± 0,02	0,78 ^{cB} ± 0,03	1,04 ^{bA} ± 0,04	1,04 ^{bA} ± 0,06
20%	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,16 ^{bC} ± 0,01	0,92 ^{bB} ± 0,01	1,12 ^{abA} ± 0,07	1,12 ^{bA} ± 0,09
0	<0,01 ^{aD} ± 0,01	0,29 ^{aC} ± 0,05	1,00 ^{aB} ± 0,04	1,25 ^{aA} ± 0,08	1,36 ^{aA} ± 0,08

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Verifica-se que as concentrações de inoculo (10^5 e 10^3 esporos/mL) do micro-organismo *Aspergillus* sp. (F2) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações durante 24 horas de controle, não apresentando crescimento, assim como o observado para o micro-organismo

Penicillium sp. (F1). Ao analisar a concentração inicial de 10^5 esporos/mL as concentrações de enzima de 50, 40 e 30%, apresentaram inibição do crescimento celular do *Aspergillus* sp. em todos os tempos avaliados, diferindo do ensaio sem a aplicação da enzima (0%). Já para o inoculo de 10^3 esporos/mL observou-se inibição do crescimento nos tempos de 48 a 115h para todas as concentrações de enzima avaliadas, quando comparado ao controle (0% enzima), apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

A Tabela 7 refere-se aos resultados do efeito inibitório da quitinase sobre o crescimento celular do micro-organismo isolado e codificado como F3 e identificado como *Penicillium* sp. empregando inoculo de 10^5 e 10^3 esporos/mL.

Tabela 7. Ação da quitinase sobre o crescimento celular *Penicillium* sp. (F3) com 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL..

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
10^5 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,22 ^{bc} ± 0,02	0,41 ^{dB} ± 0,02	0,60 ^{dA} ± 0,06
40%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,23 ^{bc} ± 0,06	0,42 ^{cdB} ± 0,06	0,66 ^{cdA} ± 0,02
30%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,23 ^{bc} ± 0,06	0,53 ^{bcB} ± 0,06	0,71 ^{ca} ± 0,03
20%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,27 ^{abc} ± 0,04	0,53 ^{bB} ± 0,04	0,85 ^{bA} ± 0,04
0	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,33 ^{ac} ± 0,03	1,07 ^{aB} ± 0,03	1,38 ^{aA} ± 0,03
10^3 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{bd} ± 0,01	0,25 ^{ac} ± 0,05	0,42 ^{aB} ± 0,05	0,84 ^{bA} ± 0,03
40%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{bd} ± 0,01	0,25 ^{ac} ± 0,05	0,43 ^{aB} ± 0,04	0,84 ^{bA} ± 0,03
30%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{bd} ± 0,01	0,19 ^{ac} ± 0,01	0,43 ^{aB} ± 0,09	0,92 ^{aA} ± 0,02
20%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,11 ^{ad} ± 0,02	0,17 ^{ac} ± 0,03	0,43 ^{aB} ± 0,05	0,95 ^{aA} ± 0,01
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,11 ^{ad} ± 0,02	0,21 ^{ac} ± 0,06	0,46 ^{aB} ± 0,03	0,95 ^{aA} ± 0,01

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Para o inoculo 10^5 esporos/mL verifica-se que em todas as concentrações de enzima estudadas, houve inibição do crescimento celular em relação ao controle durante 115h de cultivo. Por outro lado, o inoculo na concentração de 10^3 esporos/mL, observa-se que o crescimento microbiano foi estatisticamente ($p < 0,05$) igual ao controle para todas as concentrações de enzima durante 96h de cultivo, sendo que em 115h as concentrações de 50 e 40% inibiram o crescimento se diferenciando das demais concentrações e do controle (sem enzima).

A Tabelas 8 apresenta os resultados do efeito inibitório da quitinase sobre o crescimento celular do micro-organismo isolado e codificado como F4 e identificado como *Aspergillus* sp. empregando inoculo de 10^5 e 10^3 esporos/mL, respectivamente. Onde, para a concentração inicial de 10^5 esporos/mL, observa-se que nas concentrações de 40 e 50% ocorre inibição do crescimento durante 115h, diferindo das demais concentrações e do controle (sem enzima). Enquanto na concentração inicial de 10^3 esporos/mL há inibição do crescimento em todas as concentrações de enzima nas 96 e 115h, quando comparado ao controle.

Tabela 8. Ação da quitinase sobre o crescimento celular *Aspergillus* sp. (F4) com 10^5 esporos/mL e 10^3 esporos/mL.

Concentração	Tempo(h)				
	24	48	72	96	115
10^5 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,18 ^{cc} ± 0,03	0,48 ^{ab} ± 0,08	0,49 ^{db} ± 0,01	0,72 ^{ba} ± 0,09
40%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,21 ^{bcC} ± 0,01	0,49 ^{ab} ± 0,05	0,49 ^{db} ± 0,03	0,85 ^{ba} ± 0,07
30%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	0,23 ^{abC} ± 0,01	0,53 ^{ab} ± 0,02	0,55 ^{cb} ± 0,03	1,05 ^{aA} ± 0,06
20%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,24 ^{abD} ± 0,02	0,54 ^{aC} ± 0,02	0,65 ^{bB} ± 0,01	1,05 ^{aA} ± 0,03
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,25 ^{aD} ± 0,01	0,55 ^{aC} ± 0,01	0,73 ^{aB} ± 0,04	1,10 ^{aA} ± 0,03
10^3 esporos/mL					
50%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{bd} ± 0,01	0,30 ^{bc} ± 0,03	0,37 ^{cb} ± 0,02	0,57 ^{da} ± 0,01
40%	<0,01 ^{aC} ± 0,01	<0,01 ^{bc} ± 0,01	0,31 ^{abB} ± 0,05	0,38 ^{cb} ± 0,04	0,67 ^{ca} ± 0,01
30%	<0,01 ^{ad} ± 0,01	<0,01 ^{bd} ± 0,01	0,33 ^{abC} ± 0,03	0,39 ^{cb} ± 0,02	0,67 ^{ca} ± 0,02
20%	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,11 ^{ad} ± 0,02	0,35 ^{abC} ± 0,06	0,48 ^{bB} ± 0,03	0,98 ^{ba} ± 0,02
0	<0,01 ^{aE} ± 0,01	0,13 ^{ad} ± 0,03	0,42 ^{aC} ± 0,06	0,74 ^{aB} ± 0,09	1,07 ^{aA} ± 0,02

*Médias seguidas de mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Tukey com 95% de confiança.

Ao analisar as Tabelas de 5 a 8, verifica-se que a concentração de 50% e 40% da enzima quitinase apresentou melhor efeito inibitório do crescimento fúngico para os micro-organismos isolados da superfície de salame, comportamento similar ao observado para a enzima β -glucanase (Tabelas 1 a 4).

Algumas publicações têm apresentando a eficácia da quitinase quando se refere a sua aplicação para a inibição de fungos. Cabanas (2013) avaliou a atividade antifúngica de quitinase de macieira produzida e clonada em levedura *Pichia pastoris*, onde descreve a inibição de *Botrytis cinerea*, apresentando uma inibição de 58,03% como melhor resultado contendo a concentração mais elevada da enzima.

Fleuri; Sato (2008) verificaram o crescimento dos fungos *Rhizopus oligosporus*, *Mucor miehei*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *Paecilomyces sp.* e *Trichoderma viride* foi inibido pela preparação bruta de quitinase da linhagem *Cellulosimicrobium cellulans* 191, sendo que foram observados halos de inibição. O crescimento dos fungos *Penicillium sp.*, *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* não foram inibidos pela enzima.

Sela-Buurlage et al. (1993) verificaram a atividade antifúngica de diferentes isoformas de quitinases e β -1,3glucanases do tabaco que apresentaram atividade contra esporos de *Fusarium solani*. Ji & Kùc (1996) descreveram a atividade antifúngica de β -1,3 glucanase e quitinase de pepino (*Cucumis sativus L.*) sobre *Colletotrichum lagenarium*. A ação das enzimas promoveu um efeito sinérgico na inibição do crescimento do fungo, além de lise das hifas e crescimento anormal.

5.5 Análise Visual

Visando verificar a eficácia da enzima β -glucanase e quitinase sobre os fungos previamente crescidos, realizando a aplicação destas enzimas nas diferentes concentrações, em placas de petri contendo os fungos filamentos previamente isolados e identificados, cultivados em meio PDA durante 24h a 30°C.

A Tabela 9 apresenta os resultados referentes ao Teste de diferença do controle obtido pela análise visual da inibição dos fungos F1, F2, F3 e F4, respectivamente, através da aplicação superficial de diferentes concentrações da β -glucanase em relação ao padrão (sem enzima).

Tabela 9. Teste de comparação múltipla, análise visual do controle dos fungos F1, F2, F3 e F4 através da aplicação superficial de diferentes concentrações de enzima β -glucanase em relação ao padrão (sem enzima).

Cetoconazol	50%	40%	30%	20%	Padrão (sem enzima)	
F1						
Média	8,00 ^d	5,62 ^c	3,81 ^b	3,24 ^b	1,86 ^a	1,14 ^a
F2						
Média	8,00 ^f	5,43 ^e	4,52 ^d	3,14 ^c	1,57 ^b	0,48 ^a
F3						
Média	7,83 ^b	2,61 ^a	2,17 ^a	2,26 ^a	1,19 ^a	0,57 ^a
F4						
Média	8,00 ^d	5,29 ^c	4,00 ^b	3,29 ^a	2,47 ^a	1,41 ^a

*Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente da amostra padrão com 95% de confiança (Tukey).

Ao analisar a Tabela 9, observou-se que para o *Penicillium* sp. (F1) e *Aspergillus* sp. (F4) as amostras aspergidas com uma concentração de enzima de 50%, 40% e 30% apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparadas a amostras padrão, já a amostra contendo 20% de enzima não apresentou diferença significativa quando comparada a amostra padrão em relação ao aspecto visual de morte dos fungos. Para o *Aspergillus* sp. (F2) houve uma diferença significativa para todas as amostras quando comparadas com a amostra padrão. E para o *Penicillium* sp. (F3) verificou-se que nenhuma das amostras apresentou diferença significativa quando comparadas a amostra padrão em relação à coloração do fungo.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9, pode-se perceber que os julgadores observaram que ao utilizar a concentração de 50% e 40% de enzima houve uma significativa redução quando comparado ao padrão (sem enzima), mas também diferiu estatisticamente do controle negativo (com cetoconazol), exceto para o fungo filamentosos F3, que é o de coloração branca, possivelmente o aplicado na superfície do salame pela indústria.

Considerando-se a eficácia de todos os tratamentos da concentração inibitória mínima e da análise visual, conclui-se que a concentração de 50% e 40% de β -glucanase pode ser recomendada como tratamento curativo para os fungos F1, F2 e F4, ou seja, de controlar o crescimento de fungos indesejáveis na superfície de salame durante o processo industrial de cura.

Os resultados observados através da análise visual podem ser observados nas Figuras 6, 7, 8 e 9 que apresentam o aspecto visual dos fungos F1, F2, F3 e F4, respectivamente, após a aspersão da β -glucanase nas diferentes concentrações.

A atividade das glucanases ocorre em todos os estágios do ciclo de vida fúngico, incluindo a autólise. A resistência das hifas à lise celular tem sido atribuída ao equilíbrio entre a síntese e a hidrólise de uma variedade de ligações β -glicosídicas (Whiteet al., 2002).

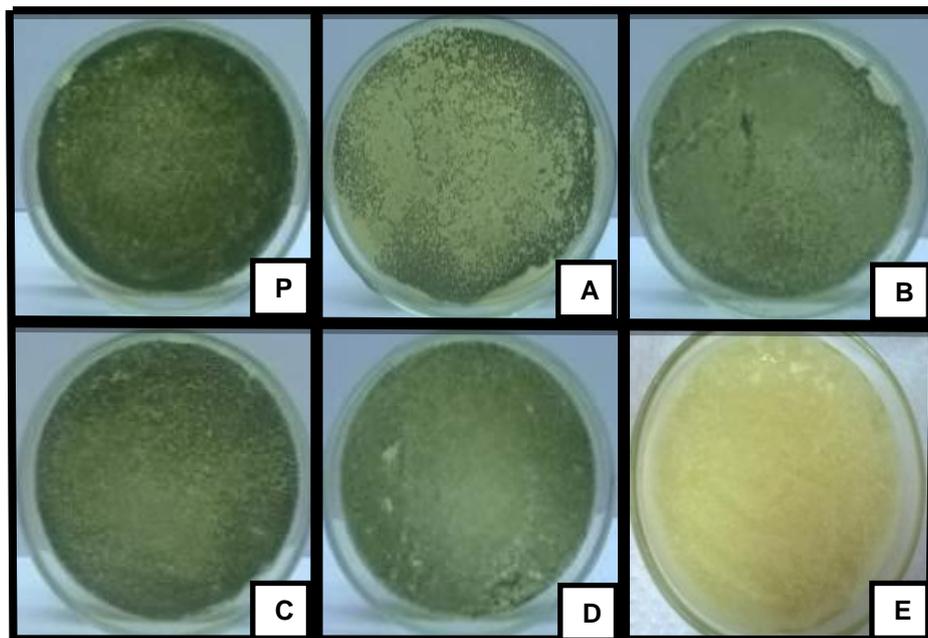


Figura 6. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo *Penicillium* sp. (F1).

P = Padrão; A = 50%; B = 40%; C = 30%; D=20%; E= Cetoconazol (controle negativo)

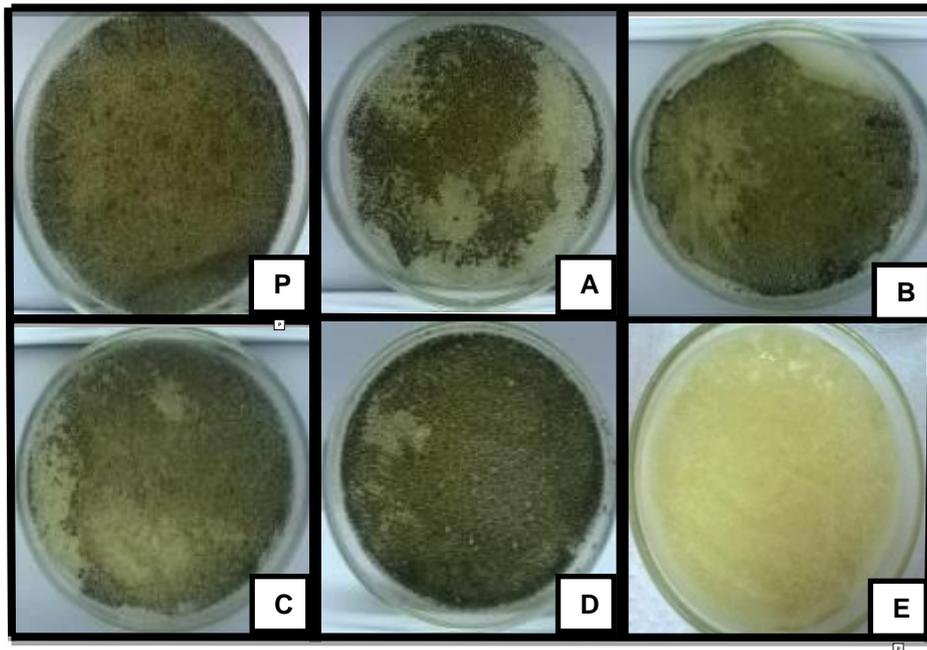


Figura 7. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo *Aspergillus* sp. (F2).
 P = Padrão; A = 50%; B = 40%; C = 30%; D=20%; E= Cetoconazol (controle negativo).

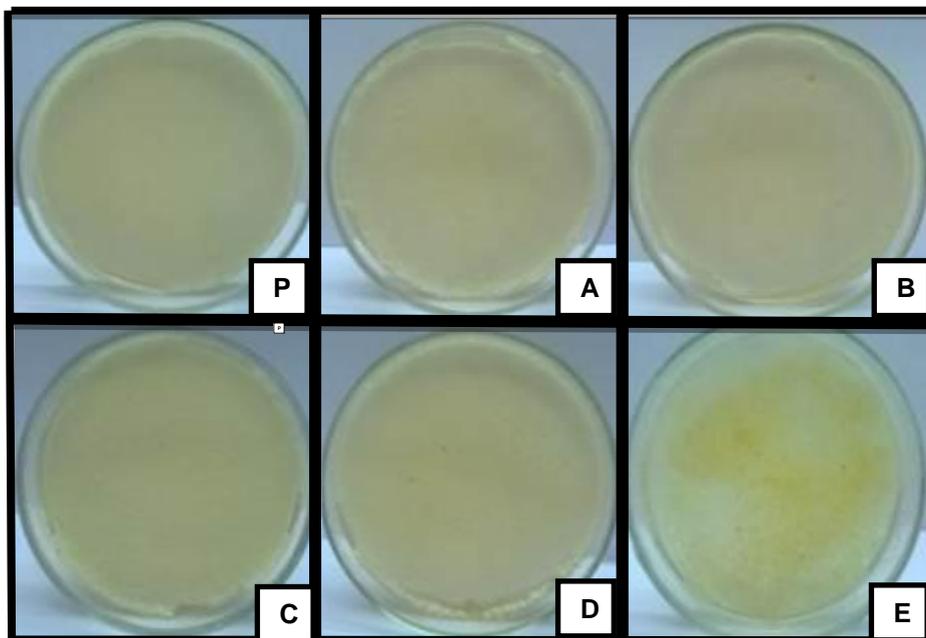


Figura 8. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo *Penicillium* sp.(F3).
 P = Padrão; A = 50%; B = 40%; C = 30%; D=20%; E= Cetoconazol (controle negativo).

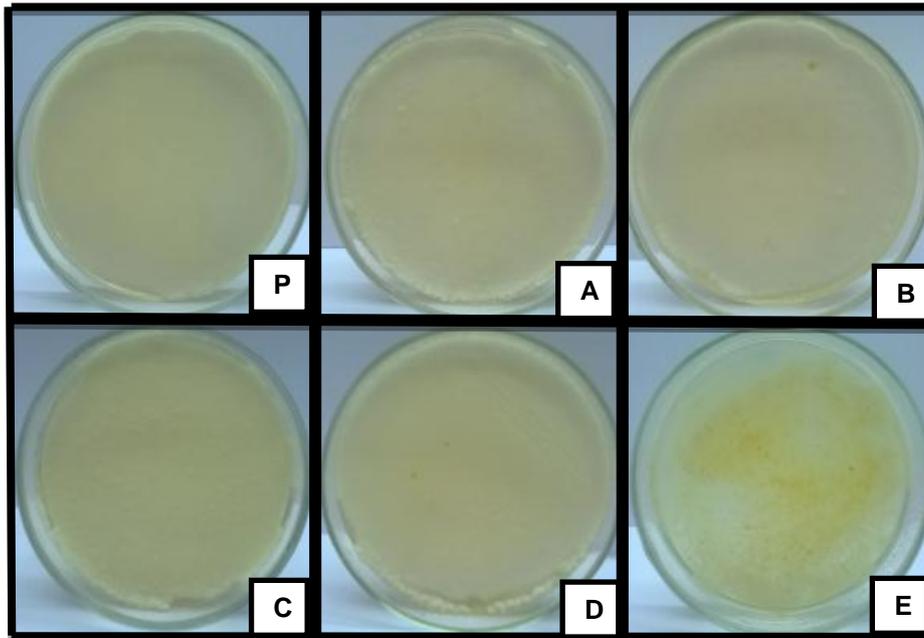


Figura 9. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo *Aspergillus* sp. (F4).
P = Padrão; A = 50%; B = 40%; C = 30%; D=20%; E= Cetoconazol (controle negativo).

A Tabela 18 apresenta os resultados referentes ao Teste de diferença do controle obtido pela análise visual da inibição dos fungos F1, F2, F3 e F4, respectivamente, através da aplicação superficial de diferentes concentrações da quitinase em relação ao padrão (sem enzima).

Tabela 10. Teste de diferença do controle, análise visual do controle dos fungos F1, F2, F3 e F4 através da aplicação superficial de diferentes concentrações de enzima quitinase em relação ao padrão (sem enzima).

	Cetoconazol	50%	40%	30%	20%	Padrão (sem enzima)
	F1					
Média	8,00 ^e	5,88 ^d	5,36 ^c	4,88 ^b	3,28 ^a	1,12 ^a
	F2					
Média	8,00 ^d	6,11 ^c	5,82 ^b	2,18 ^a	1,46 ^a	0,43 ^a
	F3					
Média	8,00 ^b	2,00 ^a	2,00 ^a	1,83 ^a	1,52 ^a	0,35 ^a
	F4					
Média	8,00 ^e	6,08 ^d	4,96 ^c	3,79 ^b	1,83 ^a	0,83 ^a

*Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente da amostra padrão com 95% de confiança (Tukey).

A Tabela 10 demonstra que o *Penicillium* sp. (F1) e *Aspergillus* sp. (F4), para as amostras aspergidas com uma concentração de enzima de 50, 40 e 30%, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparadas a amostras padrão, em relação à coloração dos fungos. Já para o *Aspergillus* sp. (F2) apenas as amostras aspergidas com 50 e 40% de enzima apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. E para o *Penicillium* sp. (F3) verificou-se que nenhuma das amostras apresentou diferença ($p < 0,05$) quando comparadas a amostra padrão.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, pode-se perceber que os julgadores observaram que ao utilizar a concentração de 50%, 40% e 30% de enzima para os fungos isolados como o *Penicillium* sp. (F1) e *Aspergillus* sp. (F4) houve uma significativa redução quando comparado ao padrão (sem enzima). Para o fungo filamentososo *Aspergillus* sp. (F2) apenas as concentrações de 50 e 40% de enzima apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparadas ao padrão, mas também diferiu estatisticamente do controle negativo (com cetoconazol), exceto para o fungo filamentososo F3, que é o de coloração branca, possivelmente o aplicado na superfície do salame pela indústria.

Considerando-se a eficácia de todos os tratamentos da concentração inibitória mínima e da análise visual, conclui-se que as concentrações de 50 e 40% de quitinase podem ser recomendadas como tratamento curativo para os fungos F1, F2 e F4, ou seja, de controlar o crescimento de fungos indesejáveis na superfície de salame durante o processo industrial de cura.

As Figuras 10, 11, 12 e 13 apresentam o aspecto visual dos fungos F1, F2, F3 e F4, respectivamente, após a aspersão da quitinase nas diferentes concentrações.

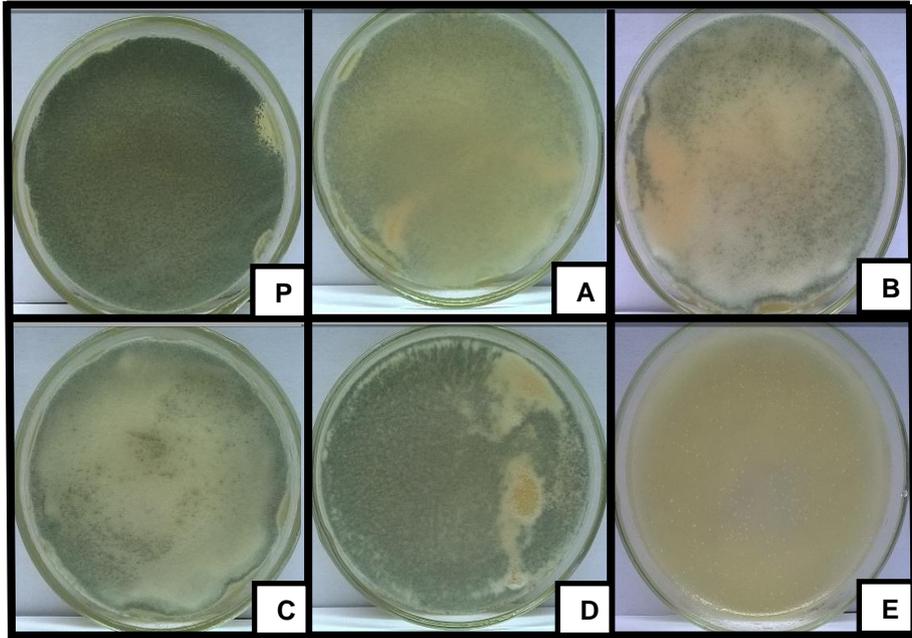


Figura 10. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo *Penicillium* sp. (F1).
 P = Padrão; A = 50%; B = 40%; C = 30%; D=20%; E= Cetoconazol (controle negativo).

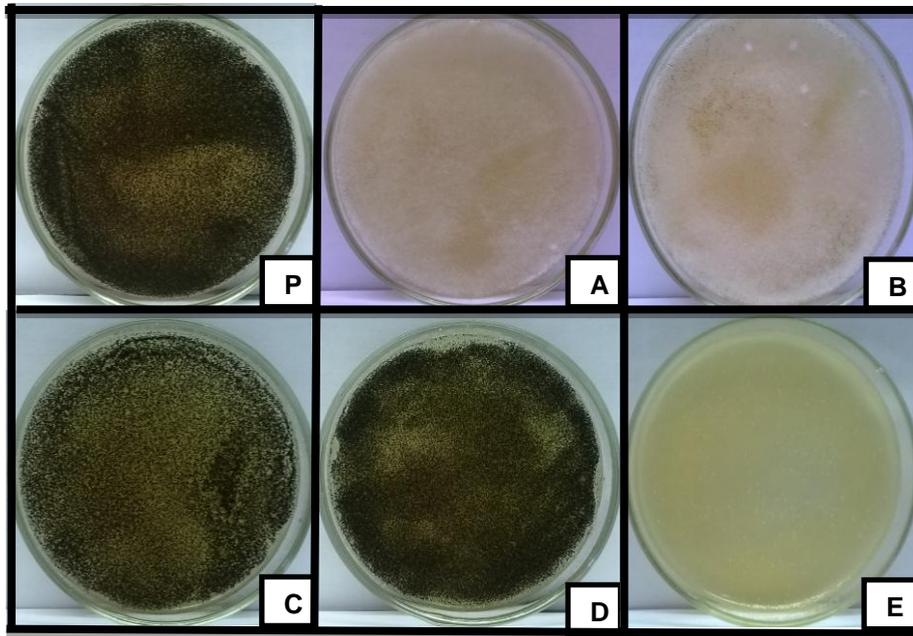


Figura 11. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo *Aspergillus* sp. (F2).
 P = Padrão; A = 50%; B = 40%; C = 30%; D=20%; E= Cetoconazol (controle negativo).

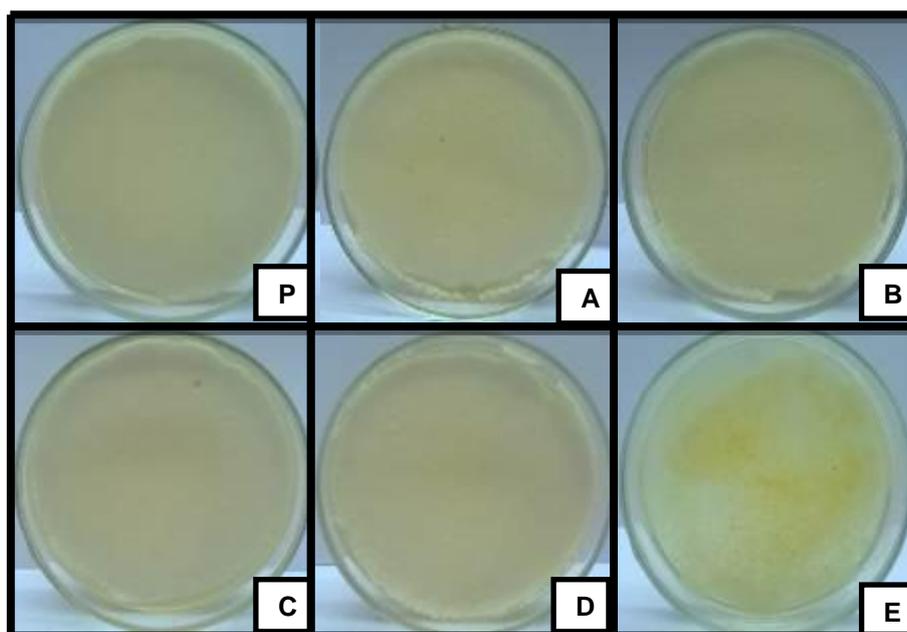


Figura 12. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo *Penicillium* sp.(F3).
 P = Padrão; A = 50%; B = 40%; C = 30%; D=20%; E= Cetoconazol (controle negativo).

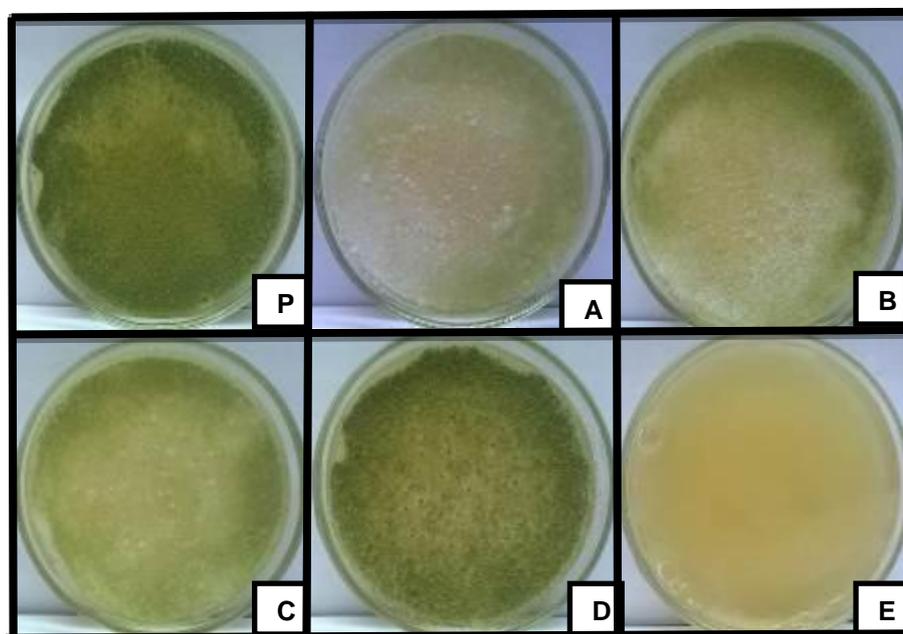


Figura 13. Aspecto Visual das seis amostras apresentadas para o fungo *Aspergillus* sp. (F4).
 P = Padrão; A = 50%; B = 40%; C = 30%; D=20%; E= Cetoconazol (controle negativo).

Diversos ensaios *in vitro* sobre fungos demonstraram pouca inibição da quitinase por si só, o que pode indicar que o papel efetivo desta proteína dependa da atividade simultânea de β -1,3- glucanase ou outra substância antifúngica que potencie o seu efeito (EBRAHIM et al., 2011; FERREIRA et al., 2007), podendo ser este um dos motivos pelo qual ocorreu uma pequena inibição do crescimento celular para os fungos testados nos diferentes tempos e concentrações. Devido à quitinase atuar no início do desenvolvimento do fungo, surge o interesse da utilização destas proteínas como fungicida para atuar no início do crescimento microbiano (EBRAHIM et al., 2011).

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Foram isolados quatro micro-organismos da superfície do salame e identificados como sendo dois do gênero *Aspergillus* e dois *Penicillium*.

- A partir dos resultados das análises da concentração inibitória mínima, realizadas *in vitro*, as enzimas β -glucanase e quitinase apresentaram maior inibição do crescimento celular na concentração de 50%.

- Os resultados na análise visual comprovaram que a aspersão da β -glucanase na concentração de 50% e a quitinase nas concentrações de 50 e 40% inibem o crescimento dos fungos *Penicillium* sp. (F1), *Aspergillus* sp. (F2) e *Aspergillus* sp. (F4), respectivamente.

- Diante dos resultados da concentração inibitória mínima e a análise visual pode-se concluir que a ação da enzima β -glucanase apresentou um melhor resultado para os testes da concentração inibitória mínima já a ação na enzima quitinase demonstrou melhor resultado para análise visual.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nas conclusões obtidas através deste estudo, bem como dos conhecimentos adquiridos, seriam bem vindos estudos que avaliassem a ação antifúngica em escala industrial, possibilitando definir quais as concentrações seriam ideais para inibição dos fungos filamentosos durante o processo industrial.

Outra possibilidade é avaliar a mistura das enzimas β -glucanase e quitinase *in vitro*, para verificar qual o efeito inibitório na lise celular.

Também é viável realizar análise sensorial com o objetivo de verificar a aceitação dos salames aspergidos com enzimas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B.B.; HEGGSET, E.B.; NORBERG, A.L.; SØRLIE, M.; VÅRUM, K.M.; EIJSINK, V.G.H. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**. v. 8, p. 1482-1517, 2010.

ADUKWU EC.; ALLEN SCH.; PHILLIPS CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. p.113:1217-1227, 2012.

ANDERSEN, S. J. Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. **Journal of Food Protection**. v. 58, p. 426-429, 1995.

BACUS, J. N. Fermented meat and poultry products. In: A. M. Pearson and T. R. Dutson, Editors. **Advances in meat research. Meat and poultry microbiology**, London: AVI Publishing, p. 123-164, 1986.

BARNETT, H. L.; BARRY, B.; HUNTER B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. TITLE. 1986.

BAUERMEISTER, A; REZENDE, I. M.; GIESE, C. E; DEKKER, H. F. R.; BARBOSA, M. A. β -1,3- Glucanases Fúngicas: produção e aplicações tecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 75-86, 2010.

BECKES, A. M. **Desenvolvimento de Produtos Carne Fermentado Adicionado Óleo de Canola**. 2011. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. **Mycotoxins**. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v. 16, n. 3, p. 497 - 516, 2003

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CÓDON, A. C. Mecanismos de controle biológico de cepas de *Trichoderma*. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.

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

BHAGWAT, A. A.; GROSS, K. C.; TULLY, R. E.; KEISTER, D. L. β -Glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (ndvc) influencing β -1,6 linkages. **Journal of Bacteriology, Baltimore**, v. 178, p. 4635-4642, 1996.

BLATTEL, V.; LARISKA, M.; PFEIFFER, P.; NOWAK, C.; EICH, A.; ECKELT, J.; KONIG, H. β -1,3-glicanase from *Delftia tsuruhatensis* strain MV01 and its potential application in vinification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 983-990, 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001, Aprova a extensão de uso de Natamicina (Pimaricina) (INS 235), como conservador, para tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos no limite máximo de 1mg/dm² ausente em 5 mm de profundidade, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria da defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº. 22, de 31 de julho de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Salame Tipo Italiano**. Publicado no Diário Oficial da União de 03 de agosto de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília-DF. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997.

BREMMEGAARD, A. Truslen fra multiresistente mikroorganismer. **Ugeskrift for Laeger**, v. 160, p.6329–6344, 1998.

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

BRUSTOLIN, J. C. **Uso de natamicina no Controle do Desenvolvimento de Fungos em Salames Tipo Italiano**. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

CABANAS, A. S. P. **Avaliação da atividade antifúngica de quitinases de macieira**. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônoma) – Universidade de Lisboa, Lisboa.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 25-32, 2005.

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

CASTELLANI, D. C.; DOMENICO, C. I.; RONCOLETTA, L. M. A.; SILVA, A. C.; TOZAKI, R. M.; OLIVEIRA, D. H. Coeficientes técnicos de produção de priprioca (*Cyperus articulatus* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, especial, p. 606-611, 2011.

CASTORIA, R.; DE CUTRIS, F.; LIMA, G.; DE CICCO, V. β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Techonology**, Amsterdam, v. 12, p. 293-300, 1997.

CASTRO, L. C.; LUCHESE, R. H.; MARTINS, J. F. P. Effect of *Penicillium nalgiovense* starter culture on salami quality. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, n. 1, 2000.

CIROLINI, A.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; MILANI, L. I. G.; URNAU, D. Salame tipo italiano elaborado com culturas *starters* nativas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 771-779, 2010.

COLEN, G. **Isolamento e seleção d fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

COLLINGE, D. B.; K. M.; KRAGH, J. D.; MIKKELSEN, K.K.; NIELSEN, U.; RASMUSSEN.; K. VAD. **Plant chitinases**. *Plant J.*, 3: 31-40, 1993.

COOK, P. E. Fungal ripened meats and meat products. In: Campbell-Platt, G. and Cook, P.E. **Fermented meats**, Glasgow: Blackie Academic and Professional. p. 110–129, 1995.

CORNELISSEN, B. J. C.; MELCHERS, L. S. Strategies for control of fungal diseases in plants. **Plant Physiology** 101: 709-712, 1993.

DAENEN, L.; SAISON, D.; STERCKX, F.; DELVAUX, F. R.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 104, p. 478-488, 2008.

DAHIYA, N.; TIWARI, R.; TIWARI, R. P.; HOONDAL, G. S. Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern. **Electron Journal Biotechnology**. v. 8, 134–145, 2005.

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

DELMER, D. P. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, Palo Alto, v. 50, p. 245-276, 1999.

DRAGONI, I.; CANTONI, C.; SPADA, S. Ammuffiamento nero di insaccati crudi stagionati. **Industrie Alimentari**, v. 3, p. 219-222, 1986.

DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; XIRAPHI, N., MOSCHONAS, G.; GAITIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, p. 307-317, 2005.

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalyst for food processes. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 78-85, 1991.

EBRAHIM S.; USHA K.; SINGH B. Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism, Vol. 2: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances (ed. by A Mendez Vilas) Formatex Research Center, pp. 1043-1054, 2011.

EL GHAOUTH, A.; ARUAL, J.; GRENIER, J.; ASSELIN, A. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, S. Paul, v.82, p.398-402, 1992.

EL-KATATNY, M.H.; SOMITSCH, W.; ROBRA, K.H.; EL-KATATNY, M. S.; GÜBITZ, G. M. Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. **Food Technology and Biotechnology**. 38:173-180, 2000.

ESSID, I.; ISMAIL, H.B.; AHMED, S.B.H.; GHEDAMSI, R.; HASSOUNA, M. Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**, v. 77, n. 2, p. 204-212, 2007.

FERNÁNDEZ, M.; ORDÓÑEZ, L. A.; BRUNA, J. M.; HERRANZ, B.; HOZ, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. **Food Science and Technology**. v. 11, p.201-209, 2001.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, vol. 8, n. 5, p. 677-700, 2007.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Agentes antimicrobianos químicos e naturais**. 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2015.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 Glucanases e quitinases: aplicação na lise de leveduras e inibição de fungos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, p. 1224-1231, 2008.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. β -1,3 Glucanase. **Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento**. v. 37, p.40-43, 2007.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**. v. 28, n. 5, p. 871, 2005.

FORREST, J.C., ABERLE, E.D., HEDRICK, H.B., JUDGE, M.D., MERKEL, R.A. **Fundamentos de Ciencia de la Carne**. Zaragoza: Acribia, 363p., 1979.

FREO, J.D.; REOLON, J. Qualidade dos produtos derivados de carne e leite, industrializados pelas agroindústrias de Frederico Westphalen, RS. São Paulo: **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, n. 140, p. 53-60, abr., 2006.

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, 2002. p. 3915-3917, 2002.

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.

GARDNER, K.H.; BLACKWELL, J. Refinement of structure of beta-chitin. **Biopolymers**. v. 14, p. 1581–1595, 1975.

GOHEL V.; SINGH A.; VIMAL M.; ASHWINI P.; CHHATPAR HS. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal of Biotechnology** 5: 54-72, 2006.

GUILLOUX-BENATIER, M.; PAGEAULT, O.; MAN, A.; FEUILAT, M. Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 25, p. 193-197, 2000.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Tradução: Eduardo César Tondo. Porto Alegre: Artmed, 712p, 2005.

JI, C.; KÜC, J. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 257, 1996.

JOSE, D.; JAYESH, P.; GOPINATH, P.; MOHANDAS, A.; SINGH, I.S.B. Potential application of β -1,3 glucanase from an environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa* MCCB 123 in fungal DNA extraction. **Indian Journal of Experimental Biology**, vol.52, p. 89-96, 2014.

KIM, K. S.; CHANG, J. E.; YUN, H. S. Estimation of a soluble β -glucan content of yeast cell wall by the sensitivity to Glucanex 200G treatment. **Enzyme and Microbial Technology**. V, 35, n.6, p.672, 2004.

KUMAR, R.; MAJETI, N.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, India , v. 46, p. 1– 27, 2000.

KLIS, F. M. **Review: Cell wall assembly in yeast**. *Yeast* . v.10, p.851, 1994.

LAM, S. K.; NG, T. B. Acaconin, a chitinase-like antifungal protein with cytotoxic and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities from *Acacia confuse* seeds. **ACTAABP**. v. 57, 2010.

LEISTNER, L.; PITT J. I. Miscellaneous Penicillium toxins. In Rrodicks, J. V., Hesseltine, C. W. & Mehlmann, M. A (Ed). **Mycotoxins in human and animal health**. Park Forest South: Pathotox Publishers, p. 639-653, 1997.

LEISTNER, L. Toxigenic penicillia occurring in feeds and foods: a review. **Food Technology in Australia**. n. 36, p. 404-413, 1984.

LEISTNER, L.; AYRES, J.C. Schimmelpilze und Fleischwaren. **Fleischwirtschaft**, v. 47, p. 1320-1325, 1967.

LIN, S. B.; LIN, Y. C.; CHEN, H. H. Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity. **Food Chemistry**. v, 116. p. 47-53, 2009.

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

LÜCKE, F. K. **Fermented sausages**. In: Wood, B. J.B. (Org) Microbiology of fermented foods. 2 ed., London: Blackie Academy Professional. v. 2, p. 441-483, 1998.

LÜCKE, F. K.; HECHELMANN, H. Starter cultures for dry sausages and raw ham. **Fleischwirtschaft** v. 67, p. 307-314, 1987.

MACEDO, R. E. F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. 2005. 210f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MADRUGA, M. S.; FIOREZE, R. **Aspectos da ciência e tecnologia de alimentos**. João Pessoa: Editora Universitária da UFPB. v. 2, p. 285, 2003.

MAISURIA, V. B.; GOHEL, V.; MEHTA, A. N.; PATEL, R. R.; CHHATPAR, H.S. Biological control of Fusarium wilt of pigeonpea by *Pantoea dispersa*, a field assessment. **Annales Microbiology** 58, 177–185, 2008.

MARCO, A.; NAVARRO, J. L.; FLORES, M. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. **Meat Science**, v. 73, p. 660-673, 2006.

MATOS, C. R. **Parahidroxifenilsalicilamida e natamicina no controle de fungos na superfície de salames tipo Milano**, 2009. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of alpha-chitin. **Journal of Molecular Biology**. v. 120, p. 167–181, 1978.

NASSU, R. T. **Utilização da carne de caprino na fabricação de embutido fermentado, tipo salame**. 1999. 154f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NEBREDA, A. R.; VAZQUEZ, C. R.; VILLA, T. G.; VILLANUEVA, J. R.; DEL REY, F. Heterogeneous glycosylation of the EXGI gene product accounts for the two extracellular exo- β -glucanases of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 220, p. 27-30, 1987.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, p. 282-285, 2002.

OLIVEIRA, L. M.; NEPOMUCENO, C. F.; FREITAS, N. P.; PEREIRA, D. M. S.; SILVA, G. C.; LUCCHESI, A. M. Propagação vegetativa de *Hyptis leucocephala* Mart. ex Benth. e *Hyptis platanifolia* Mart ex Benth. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 73-78, 2011.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 1. Ed. Goiania: UFG, v. 2, 1110 p., 1996.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Review: chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 473-483, 2000.

PEREDA, J. A. O.; RODRÍGUES, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. São Paulo: Artmed, v.2, 2005.

PITSON, S. M.; SEVIOUR, R. J.; MCDUGALL, B. M. Noncellulolytic fungal β -glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, v. 15, p. 178-190, 1993.

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

QUEIROZ, M. I.; TREPTOW, R. O. **Análise sensorial para a avaliação da qualidade de alimentos**. Rio Grande, RS, Editora da FURG, 2006. 266p.

RAPP, P. 1,3- β -glucanase, 1,6- β -glucanase and β -glucosidase activities of *Sclerotium glaucum*: synthesis and properties. **Journal of General Microbiology**, London, v. 135, p. 2847-2858, 1989.

RAST, D. M.; BAUMGARTNER, D.; MAYER, C.; HOLLENSTEINA, G. O. **Cell wall-associated enzymes in fungi**. Phytochemistry, Oxford, v. 64, p. 339-366, 2003.

REDDY, M. V. B.; BELKACEMI, K.; CORCUFF, R.; CASTAIGNE, F.; ARUL, J. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis*

cinerea and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.20, p.39-51, 2000.

RÖDEL, W.; SIEBING, A.; KRÖCKEL, L. Ripening parameters for traditional dry sausages with a mould covering. **Fleischwirtschaft International**. v. 1, p. 14-24, 1994.

ROJAS, F. J.; JODRAL, M.; GOLSALVEZ, F.; POZO, R. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. **International Journal of Food Microbiology**. v. 13, p. 249-255, 1991.

RUST, R. E. Productos Embutidos. In: PRICE, J. F., SCHW EIGERT, B. S. **Ciencia de La Carne y de Productos Cárnicos**. 2. ed. Zaragoza: Acríbia, p. 415-440, 1994.

SAGGIORATO, A. G.; GAIO, I.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; CICHOSKI, A.J. AND CANSIAN, R.L. 2012. Antifungal activity of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.): Evaluation in vitro and on an Italian-type sausage surface. **Food Bioprocess and Technology**, Vol. 5, p. 378-384.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Introduction to food-borne fungi. **Centraalbureau voor Schimmelcultures barn delft**, fourth edition. 322 p., 1995.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p. 351-362, 2001.

SAWITZKI, M. C., FIORENTINI, A. M., CUNHA JUNIOR, A., BERTOL, T. M.; SANT'ANNA, E. S. *Lactobacillus plantarum* AJ2 isolated from naturally fermented sausage and its effects on the technological properties of Milano-type salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 28, 709-717, 2008.

SELA-BUURLAGE, M. B.; PONSTEIN, A. S.; BRES-VLOEMANS, S. A.; MELCHERS, L. S.; ELZEN, P. van den; CORNELISSEN, B. Only specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. **Plant Physiology, Rockville**, v. 101, p. 857, 1993.

SELITRENNIKOFF, C. P. Antifungal Proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2883, 2001.

SILVA, J. P. L. DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.30, n.1, p. 136-141, 2010.

SINGH, B. J.; DINCHO, D. Mold as protective cultures for raw dry sausages. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 928-930, 1994.

SIMONOVÁ, M.; STROMPFOVÁ, M.; MARCINÁKOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A.; VESTERLUND, S.; MORATALLA, L. M.; CID-BOVER, S.; CAROU-VIDAL, C. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Science**, v. 73 p. 559-564, 2006.

TERRA, N. Particularidades na fabricação do salame. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n.341, p.12 -18, 2005.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Varela, 152p., 2004.

TERRA, N. N.; DE CARLI, E. M.; TELLES, M. M.; DREHMER, A. M. F.; QUADROS, C. P.; MALHEIROS, P. S.; WAGNER, R.; FRIES, L. L. M. **Antioxidante natural na melhoria da qualidade do salame tipo italiano**. In: 2º Simpósio em Ciência de Alimentos (2003: Florianópolis). Anais. Florianópolis: SBCTA, 2003.

TERRA, N. N. **Apontamentos de Tecnologia de Carnes**. São Leopoldo: Editora Unisinós, 216p., 2003.

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

TERRA, N. N. **A Cura na Industrialização da Carne, Verdades e Mitos**. In: Curso Tecnologia de Produtos Cárneos Curados. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1993.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Guaíba: Agropecuária, 56p., 2003.

VANDENDRIESSCHE, F. Meat products in the past, today and in the future. **Meat Science**, v. 78, p. 104-113, 2008.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Carne y productos cárnicos: Tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1998.

VÁSQUEZ-GARCIDUEÑAS, S.; LEAL-MORALES, C. A.; HERRERA-ESTRELLA, A. Analysis of the b-(1,3)-Glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 1442-1446, 1998.

YAMADA, E. A. A Produção de Salames. **Revista Nacional da Carne**, n. 220, P. 72-75, 1995.

YAMADA, E. A.; BERAQUET, N. J. **Embutido fermentado cozido**. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, v. 23, p.19-27, 1993.

YE X; NG T. B. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. **Protein Expression and Purification**. v. 40, p. 230-236, 2005.

XU, X. B.; TIAN, S. P. Reducing oxidative stress in sweet cherry fruit by *Pichia membrana e faciens*: a possible mode of action against *Penicillium expansum*. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 105, p. 1170-1177, 2008.

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**, v. 66, p. 415-423, 2004.

ZHAO, Y.; TU, K.; SHAO, X.; JING, X.; SU, Z. **Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit**. *Postharvest Biology and Technology*, Amsterdam, v. 49, p. 113-120, 2008.

ZOBEL, H. F. **Molecules to granules: a comprehensive starch review**. *Starch*, Weinheim, v. 40, p. 44-50, 2006.

WANG, S.; SHAO, B.; RAO, P.; LEE, Y.; YE, X. *Hypotin*, a Novel Antipathogenic and Antiproliferative Protein from Peanuts with a Sequence Similar to Those of Chitinase Precursors. **Journal of Agricultural and Resource Economics**, v. 55, p. 9792-9799, 2007.

WHITE, S.; MCINTYRE, M.; BERRY, D.R.; MCNEIL, B. The autolysis of industrial filamentous fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.22, n.1, p.1-14, 2002.