



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MÍRIAM GONÇALVES MARQUEZINI

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS
MESÓFILAS EM MORTADELAS ESTÁVEIS EM TEMPERATURA AMBIENTE E O
IMPACTO DO USO DE NITRITO OBTIDO DE FONTES VEGETAIS E DE
EXTRATO DE ACEROLA NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE ESPOROS DE
Clostridium sporogenes EM MORTADELAS ESTÁVEIS EM TEMPERATURA
AMBIENTE**

**CAMPINAS
2025**

MÍRIAM GONÇALVES MARQUEZINI

**DETERMINAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS
MESÓFILAS EM MORTADELAS ESTÁVEIS EM TEMPERATURA AMBIENTE E O
IMPACTO DO USO DE NITRITO OBTIDO DE FONTES VEGETAIS E DE
EXTRATO DE ACEROLA NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE ESPOROS DE
Clostridium sporogenes EM MORTADELAS ESTÁVEIS EM TEMPERATURA
AMBIENTE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Supervisor/Orientador: DR. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
MÍRIAM GONÇALVES MARQUEZINI, E ORIENTADA
PELO PROF. DR. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA

CAMPINAS

2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Gardenia Garcia Benossi - CRB 8/8644

M348d Marquezini, Míriam Gonçalves, 1985-
Determinação da prevalência de bactérias anaeróbias mesófilas em mortadelas estáveis em temperatura ambiente e o impacto do uso de nitrito obtido de fontes vegetais e de extrato de acerola na inibição do crescimento de esporos de Clostridium sporogenes em mortadelas estáveis em temperatura ambiente / Míriam Gonçalves Marquezini. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Clostridium. 2. Nitrito de sódio. 3. Mortadela. I. Sant'Ana, Anderson de Souza, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Determination of the prevalence of anaerobic mesophilic bacteria in bolognas stable at room temperature and the impact of the use of nitrite obtained from vegetable sources and acerola extract in the inhibition of the growth of Clostridium sporogenes spores in bolognas stable at room temperature

Palavras-chave em inglês:

Clostridium

Sodium nitrite

Bologna sausage

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

Débora Parra Baptista

Ana Lucia da Silva Correa Lemos

Márcia Mayumi Harada Haguiwara

Larissa Pereira Margalho

Data de defesa: 12-02-2025

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

ODS: 3. Saúde e bem-estar

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3577-4423>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7725752847000064>

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA
Presidente

DÉBORA PARRA BAPTISTA FREITAS
Membro Titular
FEA/UNICAMP

ANA LUCIA DA SILVA CORREA LEMOS
Membro Titular
CTC/ITAL

MARCIA MAYUMI HARADA HAGUIWARA
Membro Titular
CTC/ITAL

LARISSA PEREIRA MARGALHO
Membro Titular
FEA/UNICAMP

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Benedito e Joana pelo amor incondicional e por sempre apoiar os meus sonhos, e ao meu esposo Kleber pelo amor, confiança e porto seguro.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Deus, pelas conquistas e por sempre tomar conta do meu caminho.

Aos meus pais Benedito Marquezini e Joana D'arc Gonçalves Marquezini, por todo o esforço, carinho, amor e dedicação ao longo dos meus anos de vida.

Ao meu esposo Kleber Rodrigues, pelo amor, carinho, respeito, cumplicidade, apoio, suporte e acima de tudo paciência ao longo destes anos.

Ao professor Dr. Anderson de Souza Sant'ana pela oportunidade de realizar este sonho e pela amizade, apoio e orientação durante este período.

Aos meus colegas do Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL, pelo apoio, companheirismo, carinho, suporte e amor durante todos estes anos. Vocês são parte da minha família.

A Ana Lúcia da S. C. Lemos por nunca desistir de mim, permitir que eu pudesse alcançar este sonho e me apoiar durante nossas longas conversas nestes anos. Você me inspira todos os dias, muito obrigada!

A Universidade de Campinas (Unicamp) pelos aprendizados de todos esses anos.

Aos meus bolsistas de iniciação científica Guilherme, Maria Stella, Denise e Luana pelo carinho e dedicação em cada experimento que deu origem a este trabalho. Vocês são parte fundamental para a realização do meu sonho. Obrigada!

“Se eu vi mais longe, foi porque estava sobre os ombros de gigantes”

*Sir Isaac Newton
(1643 – 1727)*

RESUMO

Compreender a diversidade e as concentrações de bactérias esporuladas anaeróbias mesófilas, que possuem potencial patogênico ou deteriorante, em matérias-primas cárneas e ingredientes utilizados no processamento de produtos cárneos cozidos e curados, pode resultar na adoção de medidas de intervenção eficazes para controlar essa microbiota. Desta mesma forma, entender o impacto do uso de ingredientes naturais na segurança microbiológica visando atender demandas da população por alimentos sem aditivos também possui relevância nos dias atuais. Foi analisado um total de 57 amostras de massas cruas de mortadela comerciais. A quantificação dos esporos de bactérias aeróbias mesófilas foi realizado pelo método preconizado da *American Public Health Association* (APHA) e a identificação das culturas foi realizada por testes bioquímicos e morfológicos e, posteriormente, confirmada pela presença dos genes *IAC* e *colA*. A partir de três culturas de clostrídios, isoladas previamente das massas cruas de mortadela comerciais, e das culturas padrões de *C. sporogenes* foi realizado um teste de desafio de uma formulação padrão de mortadela estável em temperatura ambiente contendo nitrito sintético e nitrito obtido a partir de extratos vegetais pré-convertidos e ajustada a atividade de água (0,940, 0,955 e 0,970). As mortadelas foram armazenadas na temperatura de 26°C por 90 dias e realizados ensaios físico-químicos e microbiológicos durante o período de armazenamento. Este estudo comprovou uma prevalência de 79% de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias em massas de mortadela, sendo 7,3% destas culturas *C. sporogenes*. Ao avaliar o impacto da substituição do nitrito sintético pelo nitrito obtido a partir de extratos vegetais pré-convertidos em mortadela estável em temperatura ambiente, foi possível evidenciar que a combinação de 150 ppm de nitrito pré-convertido, 400 ppm de eritorbato ou 1500 ppm de ácido ascórbico, em valores de atividade de água de 0.940 e 0.955 podem inibir a germinação de esporos de *C. sporogenes* durante o armazenamento a 30°C por 60 dias. Com estes resultados, podemos concluir que existe o risco de esporos de clostrídios em mortadelas estáveis em temperatura ambiente, mas que o sinergismo entre a atividade de água, o nitrito e um acelerador de cura pode garantir a segurança microbiológica desta categoria de alimento.

ABSTRACT

Understanding the diversity and concentrations of mesophilic anaerobic sporulating bacteria, which have pathogenic or spoilage potential, in meat raw materials and ingredients used in the processing of cooked and cured meat products, can result in the adoption of effective intervention measures to control this microbiota. Likewise, understanding the impact of the use of natural ingredients on microbiological safety in order to meet the population's demand for additive-free foods is also relevant today. A total of 57 samples of commercial raw bologna dough were analyzed. The quantification of mesophilic aerobic bacterial spores was performed using the method recommended by the *American Public Health Association* (APHA) and the identification of the cultures was performed by biochemical and morphological tests and, subsequently, confirmed by the presence of the IAC and *colA* genes. From three cultures of clostridia previously isolated from commercial raw mortadella doughs and standard cultures of *C. sporogenes*, a challenge test was performed with a standard formulation of bologna stable at room temperature containing synthetic nitrite and nitrite obtained from pre-converted plant extracts and adjusted for water activity (0.940, 0.955 and 0.970). The bologna was stored at 26°C for 90 days and physicochemical and microbiological tests were performed during the storage period. This study demonstrated a prevalence of 79% of spores of anaerobic mesophilic bacteria in bologna, and that 7.3% of these cultures were *C. sporogenes*. When evaluating the impact of replacing synthetic nitrite with nitrite obtained from pre-converted natural plant extracts in bologna stable at room temperature, it was possible to demonstrate that the combination of 150 ppm of pre-converted nitrite, 400 ppm of erythorbate or 1500 ppm of ascorbic acid, at water activity values of 0.940 and 0.955 can inhibit the germination of *C. sporogenes* spores during storage at 30°C for 90 days. With these results, we can conclude that there is a risk of clostridial spores in bologna stable at room temperature, but that the synergism between water activity, nitrite and a curing accelerator can guarantee the microbiological safety of this food category.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da proposta de Hoagland (1910; 1914) para a ação do nitrato em carnes curadas produtos.....	28
Figura 2. Etapas do processamento do lote experimental.....	51
Figura 3. Análises instrumentais em mortadela. a) Espectrofotômetro portátil Minolta Chroma Meter 508D e b) Texturômetro Texture Analyser TA-XT2i.....	52
Figura 4. Amplificação de PCR de fragmentos de DNA das culturas CP5, JP2 e OP2 e dos padrões positivos de <i>Clostridios sporogenes</i> (PA 3679, ATCCC 3584, ATCC 11437, ATCC 19404), com o emprego do primer do gene <i>colA</i> (a) e dos genes target IOA, CBMLB, CBMLE e CBMLF.....	60
Figura 5. Resultados da curva de crescimento dos esporos dos microrganismos isolados após incubação na temperatura de 30 °C.....	61
Figura 6. Capacidade de germinação e de crescimento dos esporos em diferentes temperaturas de estocagem: a) 4 °C / 30 d; b) 10 °C / 30 d; c) 25 °C / 48 h e d) 35 °C / 48 h.....	62
Figura 7. Efeito de inibição dos agentes químicos e físicos frente aos esporos dos microrganismos isolados e do <i>C. sporogenes</i> . a) atividade de água; b) pH; c) nitrito; d) lactato de sódio; e) eritorbato de sódio e f) nitrito (150 ppm) combinado com eritorbato de sódio.....	65
Figura 8. Avaliação da resistência das culturas submetidas ao tratamento térmico de 74 °C por 15 s combinado com a adição de 150 ppm de nitrito <i>in vitro</i>	67
Figura 9. Valores médios de índice de peróxidos em mortadelas elaboradas com cura tradicional e cura natural durante o armazenamento a 26 °C ± 1 °C durante 90 dias.....	77
Figura 10. Valores médios de nitrito (g/100g) em mortadelas elaboradas com cura tradicional e cura natural durante o armazenamento a 26 °C ± 1 °C durante 90 dias.....	79
Figura 11. Valores médios da contagem de clostrídios sulfito redutores em mortadelas elaboradas com cura tradicional e cura natural durante o armazenamento a 26 °C ± 1 °C por 90 dias.....	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação por PCR neste estudo.....	43
Tabela 2. Formulação das amostras com a cura tradicional e natural.....	49
Tabela 3. Valores adicionados de cloreto de sódio na massa cárnea após ajuste de Aw..	50
Tabela 4. Resultados de esporos de mesófilos anaeróbios das massas artificialmente inoculadas.....	54
Tabela 5. Contagens de esporos de mesófilos anaeróbios das massas cruas de mortadela analisadas.....	55
Tabela 6. Caracterização bioquímica, fisiológica e morfológica das cepas das bactérias mesófilas.....	58
Tabela 7. Avaliação da atividade microbiana de compostos sobre a germinação de <i>C. sporogenes</i>	70
Tabela 8. Avaliação da atividade microbiana de blends de compostos antimicrobianos sobre a germinação de <i>C. sporogenes</i>	72
Tabela 9. Caracterização físico-química das matérias-primas.....	73
Tabela 10. Caracterização microbiológica das matérias-primas.....	73
Tabela 11. Caracterização físico-química em amostras de mortadela após 24 h do processamento.....	74
Tabela 12. Valores de atividade de água e pH em amostras de mortadela após 24 h do processamento.....	75
Tabela 13. Valores de cor objetiva L* a* b* em amostras de mortadela após 24 h do processamento.....	75
Tabela 14. Valores de perfil de textura em amostras de mortadela após 24 h do processamento.....	76

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. A segurança dos alimentos.....	16
2.1.1. Normas relacionadas à segurança microbiológica.....	18
2.1.2. Métodos analíticos para avaliar a segurança microbiológica dos alimentos...	20
2.1.3. Uso de microrganismos substitutos não patogênicos na avaliação da segurança microbiológica.....	22
2.2. Produtos cárneos curados.....	25
2.2.1. Desafios na elaboração de produtos cárneos.....	26
2.2.2. A Mortadela estável em temperatura ambiente.....	33
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	37
4.1.1. Produção de esporos.....	37
4.1.2. Quantificação e padronização da cultura de esporos.....	37
4.2. Etapa I: Prevalência, caracterização e identificação molecular dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas a partir de massas de mortadela produzidas no Brasil.....	38
4.2.1. Avaliação do método analítico para determinação de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias.....	38
a) Padronização do inóculo nas massas cruas de mortadela.....	38
b) Inoculação artificial do <i>pool</i> de esporos de <i>C. sporogenes</i> em massas cruas de mortadela.....	38
c) Detecção de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias.....	38
4.2.2. Detecção de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias em massas cruas de mortadelas comerciais.....	39
a) Coleta das amostras.....	39
b) Quantificação de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias.....	40
4.2.3. Isolamento, caracterização bioquímica e identificação molecular dos isolados de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias.....	40
a) Isolamento de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias.....	40
b) Purificação das culturas.....	40
c) Caracterização morfológica e bioquímica das culturas isoladas.....	41
d) Identificação molecular de <i>C. sporogenes</i>	43
4.2.4. Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas de mortadelas comerciais frente às principais barreiras usadas em produtos cárneos curados e cozidos.....	44
a) Padronização das culturas de clostrídios.....	44
b) Determinação da curva de germinação dos esporos.....	44
c) Verificação da capacidade de germinação dos esporos em diferentes temperaturas.....	45
d) Avaliação do efeito inibitório de agentes químicos, físicos e biológicos na germinação dos esporos.....	45
4.3. Etapa II: Avaliação da segurança microbiológica da substituição do nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola em mortadela estável em temperatura ambiente.....	46

4.3.1. Aquisição dos extratos vegetais.....	46
4.3.2. Avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> da eficácia da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido.....	46
a) Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	46
4.3.3. Avaliação da segurança microbiológica da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola em mortadela estável em temperatura ambiente.....	48
a) Processamento do lote experimental de mortadela artificialmente contaminada com esporos de <i>Clostridium sporogenes</i>	48
b) Caracterização físico-química e microbiológica das mortadelas.....	52
c) Acompanhamento da vida útil das mortadelas.....	53
4.4. Análise estatística.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1. Produção de esporos.....	54
5.2. Etapa I: Prevalência, caracterização e identificação molecular dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas a partir de massas de mortadela comerciais.....	54
5.2.1. Avaliação do método analítico para determinação de esporos de mesófilos anaeróbios.....	54
5.2.2. Detecção de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias em massas cruas de mortadelas comerciais.....	55
5.2.3. Isolamento, caracterização bioquímica e identificação molecular dos isolados de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias.....	57
5.2.4. Identificação molecular de <i>C. sporogenes</i>	60
5.2.5. Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas de mortadelas comerciais frente às principais barreiras usadas em produtos cárneos curados e cozidos.....	61
a) Determinação da curva de germinação e crescimento dos esporos.....	61
b) Verificação da capacidade de germinação e crescimento dos esporos em diferentes temperaturas de armazenamento.....	61
c) Avaliação <i>in vitro</i> do efeito inibitório de agentes químicos, físicos e biológicos na germinação dos esporos.....	63
d) Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia do nitrito obtido a partir de extratos vegetais durante o tratamento térmico.....	67
5.3. Etapa II: Avaliação da segurança microbiológica da substituição do nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extratos vegetais em mortadela estável em temperatura ambiente.....	67
5.3.1 Avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> da eficácia da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido.....	67
5.3.2. Impactos físico-químicos, sensoriais e microbiológico da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola em mortadela estável em temperatura ambiente.....	73
a) Caracterização da matéria-prima.....	73
b) Caracterização físico-química e sensorial da mortadela.....	74
c) Vida útil.....	76
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

Produtos cárneos curados são definidos como aqueles preparados utilizando-se a adição sal, agentes de cura (nitrito e/ou nitrato), aceleradores de cura (agentes redutores), açúcares, amido e outros ingredientes tecnológicos que interferem no sabor do produto. Podemos classificá-los como crus, semicurados, curados e cozidos, e estes podem ser embutidos, porcionados, embalados a vácuo e estocados refrigerados ou em temperatura ambiente (BRASIL, 2000).

O tratamento térmico aplicado durante a produção de produtos cárneos curados é relativamente brando. Temperaturas inferiores a 100°C em pressão atmosférica normal são usadas. Este método inativa as enzimas e destrói os microrganismos sensíveis a temperaturas mais elevadas, sem modificar o valor nutritivo e as características sensoriais do alimento. Todavia o produto esteja contaminado por esporos bacterianos, esse tratamento térmico não seria eficiente para a eliminação dos mesmos (FELLOWS, 2009).

Os produtos de origem animal possuem características intrínsecas, como elevada atividade de água e altos teores de nutrientes, que se constituem em um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos (DUARTE, 2011). Por serem produtos geralmente embalados a vácuo, apresentam condições necessárias para o desenvolvimento de bactérias do gênero *Clostridium* (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). A presença de nitrito nos produtos cárneos curados inibe a germinação dos esporos de bactérias do gênero *Clostridium*. Além disso, o nitrito retarda o desenvolvimento de rancidez oxidativa, auxilia no desenvolvimento do sabor característico de carne curada e, ao reagir com a mioglobina, estabiliza a cor da carne curada (POURAZRANG et al., 2002).

A ocorrência das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) vem crescendo de modo significativo no mundo, causando um impacto na saúde da população e prejuízos econômicos. Nos Estados Unidos, estima-se que o gasto médio anual por pessoa seja de aproximadamente 1.500 dólares, originando um total anual estimado em mais de 75 bilhões de dólares (MOYE, Z. D. et al, 2018). Dentre os agentes causadores de DTA em carnes e produtos cárneos destacam-se o *Clostridium botulinum* e o *Clostridium perfringens*.

Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014), o Brasil teve 83 casos confirmados de botulismo no período de 1999 a 2014 sendo que destes, 28,9% foram a óbito. A mortadela, a carne esterilizada e a salsicha são os alimentos mais relacionados aos casos de botulismo alimentar no Brasil. Embora a incidência anual de botulismo transmitido por alimentos seja baixa em comparação com outras doenças transmitidas por alimentos, o resultado do processo de intoxicação apresenta alto risco de mortalidade (SUGIYAMA, 1980).

Bactérias esporogênicas, quando em condições desfavoráveis de sobrevivência e desenvolvimento, passam para um estado de latência. Devido ao fato dos esporos

bacterianos serem altamente resistentes a diversos agentes químicos e físicos, esta característica deve ser levada em consideração quando são aplicados tratamentos para se garantir a qualidade e a segurança de alimentos. Além de serem amplamente distribuídos na natureza, os esporos bacterianos são encontrados nos intestinos de animais e humanos. Os esporos persistem no solo e em áreas sujeitas à contaminação fecal humana ou animal (HAUSCHILD, 1993). Dentre as bactérias anaeróbias formadoras de esporos de importância para carnes e produtos cárneos acondicionados a vácuo, os representantes do gênero *Clostridium* se destacam. Estas bactérias pertencem ao grupo dos clostrídios sulfito redutores, os quais realizam a reação de redução de sulfito a sulfeto de hidrogênio a 46°C. Estas se caracterizam por serem bactérias Gram positivas, anaeróbias estritas, com formato de bastonetes, usualmente móveis (JAY, 2000). Dentre as bactérias esporogênicas de importância para carnes algumas crescem de maneira mais eficaz em temperaturas entre 30°C e 40°C, como as mesófilas, ou na faixa de 12°C a 15°C, como as psicrófilas, ou de 25°C a 30°C, como as psicrotróficas. No gênero *Clostridium* são encontradas bactérias patogênicas veiculadas por alimentos, como o *C. botulinum* e *C. perfringens* (SILVA *et al.*, 2010). A deterioração causada por clostrídios psicrófilos e psicrotróficos está associada à produção de grandes volumes de gás, acompanhada pela proteólise, perda de textura, acúmulo de líquido nas embalagens acompanhado de um odor desagradável, principalmente de gás sulfídrico (DAINTY *et al.*, 1989).

O conhecimento da diversidade bacteriana com potencial patogênico e deteriorante em matérias primas cárneas e ingredientes usados no processamento de produtos cárneos cozidos e curados, pode levar a adoção de medidas efetivas de intervenção para o controle desta microbiota. Estas informações são de grande relevância para que a indústria de carnes possa garantir a segurança microbiológica de seus produtos, assim como garantir a qualidade dos mesmos (GLASS & MARSHALL, 2013).

A cura da carne tem sido historicamente usada com a finalidade de obter produtos cárneos únicos e com melhores atributos sensoriais (cor, odor e sabor) e de qualidade, quando comparados a outros produtos cárneos (SEBRANEK & FOX, 1985). Nos dias atuais, a cura da carne é utilizada para atender a demanda dos consumidores por produtos com características sensoriais específicas. Neste contexto, o nitrito atua como um forte antioxidante, mantendo o sabor do produto, e atua também como um excelente antimicrobiano para controlar a germinação dos esporos de *Clostridium botulinum* (PEARSON & TAUBER, 1984; ABERLE *et al.*, 2001). O nitrito também é responsável por estabilizar e controlar os estados oxidativos dos lipídios, evitando a oxidação lipídica e o sabor requentado (*warmed-over flavor*) (GRAY *et al.*, 1981).

O crescente interesse dos consumidores por alimentos naturais e sem adição de aditivos químicos aumentou as demandas de consumo de produtos cárneos não curados e

sem adição de nitrito ou nitrato. Mesmo com o desenvolvimento de extratos vegetais ricos em nitrato e nitrito, até o momento nenhum substituto foi capaz de desenvolver o sabor e aroma característicos da carne curada em produtos cárneos (VASAVADA & CORNFORTH, 2005). Estudos realizados por BROWN et al. (1974) indicam que presuntos curados sem adição do nitrito apresentaram pontuações sensoriais de intensidade de sabor mais baixas ($P < 0,05$) quando comparados aos presuntos curados com 91ppm e 182ppm de nitrito. Outros estudos (MILLER et al, 1993; GLASS et al, 2024) demonstram que é possível a produção de produtos cárneos não curados e sem adição de nitrito ou nitrato, mas neste caso o uso combinado de barreiras de crescimento como o pH, atividade de água, armazenamento refrigerado (2°C a 4°C) ou outros conservadores a base de ácidos orgânicos é fundamental para a manutenção da segurança microbiológica dos produtos cárneos.

O nitrito, proveniente de extratos vegetais, denominado nitrito pré-convertido, pode ser obtido pela fermentação do suco de aipo e/ou acelga com uma cultura iniciadora (*starter*) conhecidamente redutora de nitrogênio. A cultura mais usada pela indústria de insumos desta categoria hoje é o *Staphylococcus carnosus* que converte o nitrato presente no suco de aipo e/ou acelga em nitrito. O produto final da fermentação é transformado em pó pelo processo de secagem e se torna disponível para aplicação em alimentos (SEBRANEK & BACUS, 2007). Alguns autores (DJERI, N. & WILLIAMS, 2014; DELGADO-PANDO et al, 2021) relatam a capacidade do nitrito obtido de fonte vegetal ser uma alternativa natural ao nitrito sintético em relação aos aspectos sensoriais de cor, sabor e odor. Entretanto, a avaliação da segurança microbiológica e a possível produção de compostos com potencial mutagênico e carcinogênico ainda requerem estudos e avaliações adicionais, principalmente considerando regiões como a América Latina, onde os produtos cárneos possuem formulações relativamente diferentes quando comparados a produtos cárneos produzidos nos Estados Unidos e Europa, além de frequentes abusos de temperatura durante o armazenamento refrigerado.

Considerando os pontos levantados, este estudo visa avaliar a prevalência de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas em massas de mortadela crua comercial produzidas no Brasil e o impacto do uso de nitrito obtido de extratos vegetais e extrato de acerola na inibição do crescimento de *C. sporogenes*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A segurança dos alimentos

A segurança alimentar é uma área crítica da saúde pública que visa garantir que os alimentos consumidos sejam seguros, nutritivos e livres de contaminantes. Essa preocupação é fundamental para prevenir doenças transmitidas por alimentos, que afetam milhões de pessoas anualmente em todo o mundo. Segundo a *World Health Organization* (WHO) entre os anos de 2007 e 2015 cerca de 600 milhões de pessoas adoeceram após consumir alimentos contaminados, sendo uma em cada dez pessoas no mundo, e 420 mil pessoas morreram por ano. O impacto das doenças de origem alimentar recai desproporcionalmente sobre grupos em situações vulneráveis e especialmente sobre crianças com menos de 5 anos, sendo mais elevado nos países de baixo e médio rendimento, como os países da América Latina, África e de algumas regiões da Ásia (WHO, 2015).

Neste contexto, um dos principais pilares na segurança dos alimentos é o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP), que é amplamente adotado na indústria alimentícia para identificar, avaliar e controlar perigos significativos para a segurança dos alimentos. O HACCP, desenvolvido inicialmente pela NASA em colaboração com a *Pillsbury Company* nos anos 1960, se tornou uma abordagem científica e sistemática essencial para a segurança dos alimentos (ICMSF, 1988; MORTIMORE & WALLACE, 1998; FRANCO & LANDGRAF, 2008; MORTIMORE & WALLACE, 2015). Esse sistema envolve a identificação de pontos críticos no processo de produção onde intervenções podem ser aplicadas para prevenir ou eliminar riscos, garantindo que os alimentos sejam seguros para o consumo (MORTIMORE & WALLACE, 2015).

Além do HACCP, outras ferramentas e tecnologias avançadas têm sido desenvolvidas para garantir a segurança dos alimentos. A tecnologia de rastreamento de informações por *blockchain*, por exemplo, está emergindo como uma solução promissora para aumentar a transparência e a rastreabilidade na cadeia de suprimentos alimentares. Estudos indicam que o *blockchain* pode reduzir significativamente o tempo necessário para rastrear um produto alimentício desde o produtor até o consumidor final, ajudando a identificar rapidamente a origem de contaminações. Essa tecnologia não apenas melhora a confiança do consumidor, mas também facilita ações rápidas em casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos (ISO, 2005; GRIFFITH et al, 2010; JESPERSEN, & WALLACE, 2019).

O monitoramento microbiológico é outra ferramenta crucial na segurança dos alimentos. Métodos avançados de detecção microbiológica, como a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e o sequenciamento de nova geração, permitem a identificação

rápida e precisa de patógenos alimentares (JAY, 2000; ADAMS & MOSES, 2008; DOYLE, 2009; SILVA et al, 2017). De acordo com a *American Public Health Association* (APHA) e o *International Commission on Microbiological Specifications For Foods* (ICMSF), essas técnicas têm revolucionado a capacidade de detectar contaminações antes que os produtos alcancem o mercado, contribuindo significativamente para a redução de surtos de doenças (SALFINGER & TORTORELLO, 2015; ICMSF, 2018). No entanto, a implementação dessas tecnologias exige investimentos substanciais e treinamento especializado, representando um desafio para pequenas e médias empresas do setor alimentício (ICMSF, 2011; LUNING, 2011).

Além das tecnologias e sistemas, a educação e a formação contínua de todos os envolvidos na cadeia de produção alimentar são essenciais para garantir a segurança dos alimentos. Programas de capacitação em segurança dos alimentos, que abordam desde boas práticas de higiene até o manuseio seguro de alimentos, são fundamentais para minimizar riscos (ICMSF, 2011; LUNING, 2011). A educação dos consumidores também desempenha um papel vital, já que práticas inadequadas de manuseio e preparo de alimentos em domicílios são uma fonte comum de contaminação. Segundo a WHO, a educação alimentar pode reduzir significativamente a incidência de doenças transmitidas por alimentos, destacando a necessidade de campanhas educativas eficazes (WHO, 2015).

Finalmente, a regulamentação governamental desempenha um papel crucial na segurança dos alimentos. Leis e regulamentos rigorosos, implementados e fiscalizados por autoridades de saúde, garantem que os padrões de segurança sejam cumpridos ao longo de toda a cadeia de suprimentos (ICMSF, 2011; WHO, 2015). A legislação, como a *Food Safety Modernization Act* (FSMA) nos Estados Unidos, que exige uma abordagem preventiva para a segurança dos alimentos, exemplifica como a intervenção governamental pode fortalecer a segurança dos alimentos (FDA, 2023). A cooperação internacional também é vital, especialmente em um mundo globalizado onde alimentos são comercializados entre países e continentes (ICMSF, 2011; LUNING, 2011)

A colaboração entre indústria, governo, universidades e consumidores é essencial para garantir que os alimentos sejam seguros e saudáveis para todos (WHO, 2015). Garantir que as normas relacionadas à segurança dos alimentos sejam criteriosamente avaliadas e aprovadas com base na validação de novos ingredientes e processos pela indústria e academia é fundamental para a manutenção da segurança dos alimentos.

2.1.1. Normas relacionadas à segurança microbiológica

As normas de segurança microbiológica visam prevenir, reduzir e controlar a presença de microrganismos patogênicos nos alimentos, abrangendo desde a produção até o consumo. Estas normas são elaboradas com base em análises de risco e em princípios científicos sólidos, sendo continuamente atualizadas para acompanhar os avanços na ciência e na tecnologia alimentares (ICMSF, 2011; FUNG et al, 2018; ICMSF 2018). Além disso, a harmonização das normas em nível internacional, por meio de organizações como o *Codex Alimentarius*, desempenha um papel vital na facilitação do comércio global seguro de alimentos.

A implementação eficaz das normas de segurança microbiológica requer um esforço coordenado entre governos, indústrias e consumidores. As agências reguladoras, como o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Brasil, são responsáveis pela definição e fiscalização dessas normas. Estas entidades utilizam uma combinação de inspeções, testes laboratoriais e programas de educação para garantir que os produtores e processadores de alimentos cumpram os requisitos estabelecidos.

As normas de segurança microbiológica dos alimentos também têm um impacto significativo na indústria alimentícia. O cumprimento dessas normas não só protege a saúde dos consumidores, mas também fortalece a confiança no mercado, melhora a competitividade das empresas e reduz as perdas econômicas decorrentes de surtos de doenças alimentares. Empresas que adotam práticas de segurança robustas frequentemente se destacam no mercado e obtêm benefícios econômicos a longo prazo (EFSA, 2020).

Dentre estas normas de segurança podemos destacar:

- **Normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF):** são um conjunto de diretrizes e procedimentos que visam garantir a qualidade e a segurança dos alimentos durante o processo de produção. Estas normas abordam aspectos como higiene pessoal, limpeza e desinfecção de instalações, controle de pragas e manipulação adequada dos alimentos. A implementação das BPF é fundamental para prevenir a contaminação microbiológica dos alimentos desde as etapas iniciais da produção até o consumidor final (CAC, 2003).
- **Sistemas de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC):** são uma abordagem sistemática para identificar, avaliar e

controlar os perigos microbiológicos, físicos e químicos ao longo da cadeia de produção alimentar. Baseados em princípios de análise de risco, os sistemas APPCC permitem que as empresas identifiquem pontos críticos de controle e estabeleçam medidas preventivas para garantir a segurança dos alimentos. Esses sistemas são amplamente reconhecidos como uma ferramenta eficaz na gestão da segurança dos alimentos e são frequentemente exigidos por regulamentações governamentais e padrões da indústria (ICMSF, 1988; MORTIMORE & WALLACE, 1998; BRASIL, 1998; MORTIMORE & WALLACE, 2015)

- **Normas de Rotulagem e Informação ao Consumidor:** desempenham um papel importante na comunicação de informações relevantes sobre a segurança microbiológica dos alimentos. Estas normas incluem requisitos para a declaração de ingredientes, datas de validade e informações sobre alergênicos potenciais. Além disso, em muitos países, as normas de rotulagem também exigem a inclusão de instruções de armazenamento e preparo seguro dos alimentos, ajudando a reduzir o risco de contaminação microbiológica (ANVISA, 2020)
- **Normas Regulatórias Governamentais:** são estabelecidas por agências governamentais responsáveis pela segurança dos alimentos em cada país. Essas normas são elaboradas com base em avaliações de risco e em conformidade com padrões internacionais, e têm o objetivo de proteger a saúde pública e garantir a qualidade dos alimentos disponíveis no mercado. As agências regulatórias frequentemente realizam inspeções e fiscalizações para garantir o cumprimento dessas normas e podem impor penalidades às empresas que não estejam em conformidade (BRASIL, 2022).
- **Normas Internacionais e Harmonização:** é uma preocupação crescente devido à natureza globalizada da indústria alimentícia. Organizações internacionais, como o *Codex Alimentarius*, trabalham para desenvolver e promover normas e diretrizes internacionais para a segurança microbiológica dos alimentos. A harmonização dessas normas facilita o comércio internacional, promove a segurança dos alimentos em escala global e reduz as barreiras comerciais (FRANCO & LANDGRAF, 2008; MORTIMORE & WALLACE, 2015)

- **Normas Voluntárias e Certificações:** além das normas regulatórias obrigatórias, existem também normas voluntárias e programas de certificação que as empresas podem adotar para demonstrar seu compromisso com a segurança dos alimentos. Estas normas, como a ISO 22000 e as certificações de segurança dos alimentos baseadas em sistemas de gestão, proporcionam às empresas uma estrutura para implementar e manter práticas de segurança dos alimentos robustas. A adesão a estas normas voluntárias podem melhorar a reputação da empresa e aumentar a confiança dos consumidores em seus produtos (MANNING et al, 2019)

2.1.2. Métodos analíticos para avaliar a segurança microbiológica dos alimentos

Como vimos anteriormente, as normas de segurança dos alimentos desempenham um papel fundamental na regulação dos alimentos, entretanto, o monitoramento das condições microbiológicas destes alimentos é fundamental para garantir que os procedimentos descritos nestas normas sejam efetivos. Assim, a avaliação da segurança microbiológica dos alimentos é fundamental para garantir a qualidade e a integridade dos produtos alimentícios disponíveis para consumo (ICMSF, 2018)

A avaliação da segurança microbiológica dos alimentos envolve a aplicação de métodos analíticos destinados a detectar, identificar e quantificar microrganismos patogênicos, bem como indicadores de contaminação, ao longo da cadeia de produção e distribuição alimentar (JAY, 2000; ADAMS & MOSES, 2008; DOYLE, 2009; FRANCO & LANDGRAF, 2008; SALFINGER & TORTORELLO, 2015; SILVA et al, 2017; ICMSF, 2018). Esses métodos desempenham um papel crucial na identificação de potenciais riscos à saúde pública e na implementação de medidas de controle preventivas para reduzir a incidência de doenças transmitidas por alimentos.

Uma ampla variedade de métodos analíticos está disponível para avaliar a segurança microbiológica dos alimentos, cada um com suas próprias vantagens, limitações e aplicações específicas. Estes métodos podem ser classificados em diversas categorias, incluindo métodos convencionais, como cultivo em meio de cultura, e métodos avançados, como técnicas moleculares e espectroscopia (FRANCO & LANDGRAF, 2008; SALFINGER & TORTORELLO, 2015; SILVA et al, 2017). A escolha do método adequado depende de vários fatores, como o tipo de alimento, o microrganismo-alvo e os requisitos regulatórios aplicáveis (DOYLE, 2009; SILVA et al, 2017; ICMSF, 2018).

Os métodos analíticos convencionais, como a cultura em meio de cultura, são amplamente utilizados na avaliação da segurança microbiológica dos alimentos devido à sua simplicidade, custo relativamente baixo e capacidade de detectar uma ampla gama de

microrganismos. No entanto, esses métodos podem ser demorados e exigir condições específicas de cultivo, o que pode limitar sua aplicação em certos contextos (FRANCO & LANDGRAF, 2008; SALFINGER & TORTORELLO, 2015; SILVA et al, 2017).

Por outro lado, os métodos analíticos avançados oferecem vantagens significativas em termos de sensibilidade, especificidade e rapidez de análise. Técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem a detecção rápida e específica de microrganismos-alvo, mesmo em concentrações muito baixas (JAY et al, 2005; HOORFAR, 2011; SALFINGER & TORTORELLO, 2015; SILVA et al, 2017). Além disso, a espectroscopia, incluindo a espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) e a espectroscopia de fluorescência, oferece métodos rápidos e não destrutivos para a identificação e quantificação de microrganismos e componentes específicos nos alimentos (HE et al, 2015; GÓMEZ-TORRES et al, 2018; ZHU et al, 2020; TIAN et al, 2021;)

Estes métodos analíticos possuem grande relevância quando buscamos a detecção e/ou quantificação dos microrganismos presentes nos alimentos. São técnicas usadas rotineiramente pela indústria para determinar os níveis de qualidade de seus produtos, mas também para monitorar os prazos de vida útil praticados nos alimentos (JAY et al, 2005; HOORFAR, 2011; SALFINGER & TORTORELLO, 2015; SILVA et al, 2017). Porém, a detecção de contaminantes e toxinas em alimentos representa um desafio contínuo para a indústria alimentícia. Uma ferramenta fundamental nesse processo são os testes de desafio de alimentos, que simulam as condições reais de produção e armazenamento para determinar a eficácia dos métodos de controle de patógenos (NIEMIRA, 2008; SOFOS, 2010; ICMSF, 2018).

Os testes de desafio em alimentos ganharam destaque como uma abordagem promissora para avaliar a segurança microbiológica e química dos produtos alimentícios. Os testes de desafio envolvem a exposição controlada de alimentos a agentes contaminantes ou condições adversas, visando simular situações reais de contaminação ou deterioração que este alimento enfrente durante seu processamento e vida útil (NAACMCF. 2010; SOFOS, 2010; GLASS & MARSHALL, 2013; ICMSF, 2018).

A necessidade de testes de desafio eficazes é ressaltada pela diversidade de ameaças potenciais aos alimentos, que incluem agentes patogênicos, toxinas naturais, aditivos alimentares e resíduos de produtos químicos agrícolas. Além disso, fatores como mudanças climáticas, práticas agrícolas intensivas e adaptação microbiana representam desafios adicionais na manutenção da segurança dos alimentos. Portanto, a implementação de métodos robustos de teste de desafio é fundamental para garantir a proteção dos consumidores e a conformidade regulatória na indústria alimentícia (NAACMCF. 2010; SOFOS, 2010; GLASS & MARSHALL, 2013; ICMSF, 2018)

A pesquisa científica tem avançado significativamente na compreensão dos mecanismos de contaminação e deterioração de alimentos, bem como no desenvolvimento de técnicas analíticas avançadas para detecção e quantificação de contaminantes. Nesse contexto, os testes de desafio representam uma ferramenta valiosa para avaliar a eficácia de medidas preventivas e de controle adotadas ao longo da cadeia de produção de alimentos. A capacidade de replicar condições realistas em ambiente laboratorial permite uma avaliação precisa dos riscos associados à presença de contaminantes em alimentos e auxilia na formulação de estratégias de mitigação de riscos (NAACMCF, 2010; SOFOS, 2010; ICMSF, 2011; DOGAN, 2021).

A literatura científica oferece uma variedade de abordagens e metodologias para a realização de testes de desafio em alimentos. Desde estudos que investigam a resistência de microrganismos patogênicos a condições de processamento até aqueles que avaliam a estabilidade de aditivos alimentares em diferentes matrizes, a diversidade de aplicações desses testes reflete a complexidade dos desafios enfrentados pela indústria alimentícia. A compreensão abrangente dos princípios subjacentes aos testes de desafio é essencial para a interpretação adequada dos resultados e para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de riscos (GLASS et al, 2004a; GLASS et al, 2004b; SABAH et al, 2003; NAACMCF, 2010; SOFOS, 2010; BROWN et al, 2012; TAYLOR et al, 2013; GOLDEN et al, 2017).

No entanto, apesar dos avanços significativos, alguns desafios persistem na aplicação prática dos testes de desafio em alimentos. A variabilidade intrínseca das matrizes alimentares, as interações complexas entre diferentes componentes, as barreiras de legislações regionais em relação aos microrganismos que podem ser manipulados, as estruturas laboratoriais para execução destes testes e as limitações dos modelos de simulação representam obstáculos para a padronização e a validação desses testes. Além disso, a evolução contínua das ameaças à segurança dos alimentos requer uma abordagem adaptativa e em constante evolução na condução dos testes de desafio (NAACMCF, 2010; SOFOS, 2010; ICMSF, 2018; SMITH & JONES, 2019; GARCIA et al, 2020).

2.1.3. Uso de microrganismos substitutos não patogênicos na avaliação da segurança microbiológica

Uma abordagem comum nos testes de desafio de alimentos é o uso de microrganismos substitutos não patogênicos, que são utilizados como substitutos de patógenos específicos devido à sua similaridade de resposta aos tratamentos aplicados. Estes microrganismos oferecem vantagens práticas, incluindo a facilidade de manipulação em laboratório, custos reduzidos e, o mais importante, a capacidade de fornecer

informações precisas sobre a eficácia do processo de controle de patógenos (NAACMCF, 2010; SMITH & JONES, 2019; GARCIA et al, 2020).

Entre os microrganismos substitutos não patogênicos mais comumente empregados em testes de desafio estão as espécies de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* e *Listeria innocua*, que compartilham características fenotípicas e fisiológicas com seus homólogos patogênicos, como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, respectivamente. Esses microrganismos são frequentemente utilizados em estudos de desafio de alimentos devido à sua capacidade de fornecer informações precisas sobre a eficácia dos tratamentos aplicados durante a produção e processamento de alimentos (SMITH & JONES, 2019; GARCIA et al, 2020).

A escolha dos microrganismos substitutos não patogênicos adequados é crucial para garantir a validade e a relevância dos resultados dos testes de desafio. Idealmente, os microrganismos substitutos não patogênicos devem compartilhar características semelhantes aos patógenos de interesse em termos de resistência aos processos de produção de alimentos, capacidade de sobrevivência em condições adversas e comportamento de crescimento em diferentes ambientes alimentares. No entanto, a diversidade de alimentos, as condições de processamento variáveis e a complexidade das interações microbiológicas nos sistemas alimentares dificultam a identificação de microrganismos substitutos não patogênicos que possam representar adequadamente o risco microbiológico (NAACMCF, 2010; SMITH & JONES, 2019; GARCIA et al, 2020; PATEL et al., 2021; BROWN et al, 2022).

A busca por microrganismos substitutos não patogênicos apropriados para testes de desafio em alimentos tem sido amplamente documentada na literatura científica. Estudos têm explorado uma variedade de critérios para a seleção de microrganismos substitutos não patogênicos, incluindo sua prevalência em alimentos contaminados, sua resistência a tratamentos térmicos e químicos, bem como sua capacidade de simular o comportamento dos patógenos de interesse em condições de armazenamento e processamento de alimentos. No entanto, a falta de consenso sobre quais critérios são os mais relevantes e a dificuldade em encontrar microrganismos que atendam a todos esses critérios continuam a ser desafios significativos nesta área de pesquisa (SMITH & JONES, 2019; GARCIA et al, 2020; PATEL et al., 2021; BROWN et al, 2022). No Brasil, devido a determinação da ANVISA sobre a indisponibilidade de comercialização de linhagens de *C. botulinum* e pela ausência de um laboratório de testes de desafio de alimentos com nível de segurança NB-3, opta-se pelo emprego da cepa de *Clostridium sporogenes* na avaliação da eficácia de alimentos e processos. Em outros países, como Estados Unidos e Inglaterra, por exemplo, existem laboratórios de testes de desafio que possuem uma estrutura física

adequada ao nível de segurança NB-3, sendo possível a realização de testes de desafio inoculando linhagens de *Clostridium botulinum* e a avaliação do risco de baseada na produção de toxinas botulínicas.

A evolução contínua dos métodos de detecção microbiológica e a compreensão em constante aprimoramento da ecologia microbiana em alimentos adicionam complexidade à seleção de microrganismos substitutos não patogênicos. Novas técnicas moleculares e bioinformáticas permitem uma análise mais detalhada da diversidade microbiana em alimentos, mas também destacam a necessidade de uma abordagem mais abrangente na seleção de microrganismos substitutos não patogênicos que leve em consideração não apenas sua sobrevivência e crescimento, mas também sua capacidade de interagir com outros microrganismos presentes nos alimentos (GARCIA et al, 2020; PATEL et al., 2021; BROWN et al, 2022).

Desde a sua descoberta e reconhecimento como patógenos de importância clínica e industrial, *Clostridium botulinum* e *Clostridium sporogenes* têm despertado interesse significativo na comunidade científica. Estas duas espécies bacterianas compartilham semelhanças notáveis em termos de morfologia, fisiologia e metabolismo, levantando questões sobre a sua possível relação filogenética e a extensão de suas semelhanças funcionais (JOHNSON & MONTVILLE, 1987; HATHEWAY, 1992; HAUSCHILD et al, 1993; COLLINS et al, 1994; MCCLURE, 2006; DONG et al, 2007; SEBAIHIA et al, 2007; CARTER et al, 2009; PECK et al, 2009; PECK et al, 2011; BRADBURY et al, 2012; TAYLOR et al, 2013; STRINGER et al, 2013; CARTER et al, 2015; SMITH, 2018; BOIX et al, 2022).

- **Similaridades Morfológicas e Fisiológicas:** *C. botulinum* e *C. sporogenes* compartilham uma morfologia bacteriana típica de células Gram-positivas em forma de bastonete, com a formação de esporos resistentes ao calor em condições adversas. Além disso, ambas as espécies são anaeróbias estritas, demonstrando uma notável tolerância a ambientes com baixo teor de oxigênio (JOHNSON & MONTVILLE, 1987; HATHEWAY, 1992; HAUSCHILD et al, 1993).
- **Expressão de Toxinas e Patogenicidade:** um dos aspectos mais proeminentes dessas duas espécies é a produção de toxinas com potencial patogênico. Enquanto *C. botulinum* é bem conhecido por sua produção da potente neurotoxina botulínica, associada à doença botulínica, estudos recentes têm revelado a capacidade de algumas cepas de *C. sporogenes* de produzir toxinas semelhantes. Essa descoberta suscita preocupações quanto à sua possível implicação na segurança dos alimentos e na saúde pública (COLLINS et al, 1994; CARTER et al, 2009; PECK et al, 2011; BRADBURY et al, 2012; TAYLOR et al, 2013; CARTER et al, 2015).

- **Filogenia e Genômica Comparativa:** análises filogenéticas baseadas em sequenciamento de genomas completos têm revelado uma relação genética próxima entre *C. botulinum* e *C. sporogenes*, indicando uma origem evolutiva comum. A presença de genes homólogos envolvidos na formação de esporos e na produção de toxinas ressalta a afinidade genética entre essas duas espécies (COLLINS et al, 1994; CARTER et al, 2009; PECK et al, 2009; PECK et al, 2011; BRADBURY et al, 2012; STRINGER et al, 2013; TAYLOR et al, 2013; BOIX et al, 2022).
- **Considerações sobre a Segurança dos Alimentos:** dada a semelhança genética e funcional entre *C. botulinum* e *C. sporogenes*, é crucial considerar as implicações para a segurança dos alimentos. A capacidade de algumas cepas de *C. sporogenes* de produzir toxinas semelhantes à botulínica destaca a necessidade de vigilância e medidas preventivas rigorosas para evitar a contaminação de alimentos e prevenir surtos de doenças transmitidas por alimentos (COLLINS et al, 1994; CARTER et al, 2009; BRADBURY et al, 2012; TAYLOR et al, 2013; BOIX et al, 2022).

2.2. Produtos cárneos curados

A produção de produtos cárneos é uma indústria globalmente significativa, desempenhando um papel fundamental na alimentação humana e na economia. Produtos cárneos curados representam uma categoria ampla e diversificada de alimentos que têm desempenhado um papel significativo na dieta humana ao longo da história. Esses produtos, caracterizados por processos de cura que envolvem a adição de sal, nitrito/nitrato, açúcar e outros ingredientes, possuem uma longa tradição cultural em várias partes do mundo (RUUSUNEN & PUOLANNE, 2005). A cura é um método antigo de conservação de carne que não só prolonga a vida útil dos produtos cárneos, mas também contribui para o desenvolvimento de sabores únicos e desejáveis, bem como para a melhoria da textura e estabilidade microbiológica (TOLDRÁ, 2006).

A popularidade dos produtos cárneos curados persiste até os dias atuais, com uma ampla variedade de tipos disponíveis, incluindo bacon, presunto, salame, chouriço e muitos outros. No entanto, a produção desses alimentos não está isenta de desafios, especialmente à luz das demandas crescentes por segurança dos alimentos, qualidade e autenticidade. A crescente preocupação com aditivos alimentares, como nitrito/nitrato, bem como com questões relacionadas à saúde, como teor de gordura e sal, tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de métodos alternativos de cura e formulações de produtos cárneos (PAPAMANOLI et al., 2011).

Além disso, as preferências dos consumidores estão em constante evolução, com uma demanda crescente por produtos cárneos que atendam a critérios específicos, como serem livres de aditivos químicos, provenientes de fontes sustentáveis e com perfis

nutricionais aprimorados. Nesse contexto, a pesquisa científica desempenha um papel crucial na investigação de novas tecnologias e ingredientes que possam atender a essas demandas, sem comprometer a qualidade e a segurança dos produtos cárneos curados (MORALES & FLORES, 2016).

2.2.1. Desafios na elaboração de produtos cárneos

Nos últimos anos, temos observado um aumento significativo na demanda por produtos cárneos de alta qualidade e com valor agregado, impulsionado principalmente pelas mudanças nos hábitos alimentares, mas também pelas preferências dos consumidores. No entanto, a elaboração desses produtos enfrenta diversos desafios, que vão desde questões relacionadas à qualidade e segurança dos alimentos até preocupações ambientais e éticas (GARCIA et al, 2017; SÁNCHEZ-ALDANA et al, 2020; VIDAL et al, 2021; SMITH & JONES, 2021; DELGADO-PANDO et al, 2021; KUREK et al, 2022; SBARDELOTTO et al, 2023).

Um dos principais desafios na elaboração de produtos cárneos é garantir a segurança dos alimentos, minimizando o risco de contaminação por patógenos, como *Salmonella* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes* e *C. perfringens* e *C. botulinum*. Além disso, a crescente preocupação com a saúde e o bem-estar animal tem levado os consumidores a buscarem produtos provenientes de sistemas de produção mais sustentáveis e éticos. Isso tem gerado pressão sobre a indústria para adotar práticas mais responsáveis em toda a cadeia de produção (SOFOS, 2010; WANG et al, 2018; JOHNSON & BROWN, 2019).

Outro desafio importante é atender às demandas de um mercado cada vez mais diversificado, que busca produtos cárneos com características específicas, como baixo teor de gordura, reduzido teor de sódio e ausência de aditivos artificiais (VIDAL et al, 2021; SABAH et al, 2003). Além disso, a crescente popularidade de dietas alternativas, como o vegetarianismo e o veganismo, tem impulsionado a busca por produtos cárneos à base de plantas, representando um desafio adicional para a indústria tradicional de carne (SILVA & MARTINEZ, 2020; JOHNSON & BROWN, 2019).

A busca por alternativas sustentáveis na produção de carne também tem se intensificado, com um foco crescente na redução do impacto ambiental da pecuária, como as emissões de gases de efeito estufa e o uso de recursos naturais, como água e terra. Nesse contexto, surgem desafios tecnológicos relacionados ao desenvolvimento de processos de produção mais eficientes e ambientalmente responsáveis (GARCIA et al, 2017; DELGADO-PANDO et al, 2021).

Além dos desafios técnicos e científicos, a indústria de produtos cárneos enfrenta também desafios regulatórios, decorrentes das crescentes exigências dos órgãos reguladores em relação à segurança dos alimentos, rotulagem e declaração de ingredientes.

A conformidade com essas regulamentações representa um desafio adicional para as empresas do setor (GARCIA et al, 2017; SBARDELOTTO et al, 2023).

Nos últimos anos, também temos testemunhado uma mudança significativa nas preferências dos consumidores em relação aos alimentos que consomem. Cada vez mais, os consumidores estão buscando produtos alimentícios que sejam não apenas saborosos e nutritivos, mas também feitos com ingredientes naturais e facilmente reconhecíveis. Nesse contexto, surge a tendência do *Clean Label*, que se refere à demanda por produtos alimentícios que contenham ingredientes simples, minimamente processados e livres de aditivos artificiais (GARCIA et al, 2017; WANG et al, 2018; SILVA & MARTINEZ, 2020; FLORES & TOLDRÁ, 2021; SMITH & JONES, 2021).

Os produtos cárneos representam uma categoria importante no contexto do *Clean Label*, dada a sua relevância na dieta humana e as complexidades envolvidas em sua produção. Tradicionalmente, a indústria de processamento de carne tem utilizado uma variedade de aditivos e ingredientes artificiais para melhorar a qualidade, a textura e a vida útil dos produtos cárneos. No entanto, com o aumento da conscientização dos consumidores sobre os potenciais efeitos adversos dos aditivos artificiais para a saúde, tem-se observado um interesse crescente na formulação de produtos cárneos mais limpos e naturais (GARCIA et al, 2017; WANG et al, 2018; JOHNSON & BROWN, 2019; SILVA & MARTINEZ, 2020; SMITH & JONES, 2021).

Nas últimas décadas, estudos científicos têm levantado preocupações significativas quanto aos riscos associados ao consumo de produtos cárneos curados, como mortadelas, salsichas, bacon e presunto. Estes alimentos contêm elevados níveis de conservantes, como nitritos e nitratos, que são conhecidamente usados para controlar o crescimento de alguns microrganismos patogênicos, como *C. botulinum* e *C. perfringens*, mas também são responsáveis pelas reações de cura da carne, proporcionando cor e sabor aos alimentos (TOLDRÁ, 2006; FEINER, 2016).

Originalmente, a cura da carne era a adição de sal marinho ou outro tipo de sal em pequenos cortes de carne com o objetivo de reduzir a atividade de água, prevenir o crescimento microbiano e a deterioração química. Também tinha como objetivo deixar a carne mais macia e promover sabor e aroma ao produto. No século 19, as indústrias de carne notaram que a aplicação de alguns tipos de sais ressaltava e estabilizava a cor vermelha do produto, entretanto a reação química por trás deste fenômeno ainda era desconhecida. Entre os componentes presentes nesses sais caracterizados como melhores, o nitrito de potássio (Salitre) foi reconhecido como contaminante (GREVER & RUITER, 2001).

Desta forma, a reação do nitrito na preservação ou na prevenção de alterações oxidativa permaneceu em segredo até 1891, quando o pesquisador Polenske, que fazia parte do Gabinete Imperial de Saúde Alemão, publicou um experimento em que ele comprovava que a adição de nitrato a uma solução de decapagem formava nitrito, aparentemente pela ação de microrganismos presentes na salmoura (POLENSKE, 1987). Em 1899, Lehmann confirmou que o nitrito era o agente que produzia a cor vermelha na carne e promovia a estabilidade deste pigmento no calor (Lehmann, 1899). Em 1901, Haldane descreveu a química do processo de cura, apresentando as reações de redução ocorrendo durante a cura na carne. Ele também extraiu a substância responsável pela cor vermelho brilhante de carne curada (mioglobina-NO) (Haldane, 1901). Por fim, entre 1910 e 1914, o pesquisador Hoagland demonstrou que o ânion nitrito não era o reagente, mas sim o ácido nitroso (HNO₂) ou um metabólito dele (Figura 1) (HOAGLAND, 2010; HOAGLAND, 2014). Na virada do século 20 foi compreendida que a coloração da carne se dava pelo nitrogênio, mas ainda se pensava que a atividade antimicrobiana e o aroma se dava principalmente pela concentração de sal (NaCl) (EFSA, 2003; TOLDRÁ, 2006; FEINER, 2016).

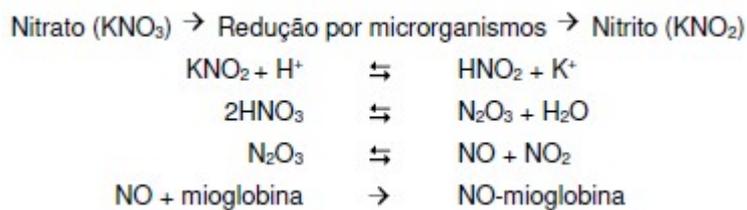


Figura 1. Esquema da proposta de Hoagland (1910; 1914) para a ação do nitrato em carnes curadas produtos no desenvolvimento da cor.

O nitrito ou ácido nitroso, quando reduzido por ação microbiana, é capaz de sequestrar o oxigênio na carne ou na massa de produtos cárneos. Esta reação inversa para formar nitrato previne os processos oxidativos e a formação do odor e sabor de ranço. Além disso, a formação de algumas substâncias aromatizantes durante o processamento da carne ou o armazenamento na presença de oxigênio, não ocorrem em carnes curadas, uma vez que o nitrito sequestra o oxigênio prevenindo a formação destes aromas. A mudança formada pela cura leva o nome de sabor de cura, e a ligação do nitrito ou seus derivados à mioglobina, forma um pigmento vermelho estável ao calor responsável pela coloração em produtos curados. É importante ressaltar, que o nitrito também reage com o ascorbato, aminoácidos e outros compostos (PEARSON & TAUBER, 1984; ABERLE et al, 2001; HONIKEL, 2008).

Ainda segundo Honikel (2008), o nitrito de sódio pode estar envolvido em diversas reações químicas interativas que ocorrem nos produtos cárneos curados. Por se tratar de um composto muito reativo, o nitrito tem a ação de agente oxidante, de agente

reductor ou agente nitrosante, podendo converter-se em compostos relevantes na obtenção de produtos cárneos curados.

Além dos benefícios de cor, sabor e controle da oxidação, o nitrito desempenha um papel fundamental na segurança dos alimentos. O nitrito foi identificado como um agente altamente eficaz tanto bacteriostático quanto bactericida, capaz de inibir ou regular o desenvolvimento de bactérias em produtos cárneos. Segundo relatado pela literatura, existem dois principais efeitos do nitrito no controle do crescimento de *Clostridium botulinum*: a inibição do desenvolvimento de células vegetativas a partir de esporos sobreviventes e a prevenção da divisão celular de células vegetativa (SHAKIL et al, 2022; HOSPITAL et al, 2016; PIERSON et al, 1983).

Estudos demonstraram que o nitrito impede a reprodução de *Clostridium botulinum* e inibe a formação de toxinas botulínicas em salsichas durante o armazenamento (PIERSON et al, 1983; HOSPITAL et al, 2016; SHAKIL et al, 2022). Durante a preservação da carne, o nitrito também reduz a quantidade de *Clostridium sporogenes*, que possui características semelhantes ao *Clostridium botulinum*. Além disso, diversos estudos indicam que o nitrito pode inibir o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus* em vários produtos cárneos. A eficácia do nitrito, o sinergismo com outros agentes antimicrobianos e seus mecanismos inibitórios variam entre as diferentes espécies bacterianas (PARTHASARATHY & BRYAN, 2012; MYERS et al, 2013; SHAKIL et al, 2022;). A atividade antimicrobiana do nitrito depende de vários fatores, como pH, nível de nitrito residual, concentração de sal, teor de ferro, presença de agentes redutores e temperatura de armazenamento, etc. (CUI & NAKANO, 2010; SHAKIL et al, 2022;). Em condições de pH ácido, por exemplo, o nitrito é mais eficaz na inibição do crescimento de microrganismos indesejados (ALLAKER et al, 2001; SHAKIL et al, 2022;).

O nitrito atua em diversos locais das bactérias, bloqueando enzimas metabólicas, restringindo a absorção de oxigênio e rompendo o gradiente de prótons. Mas é importante destacar que o nitrito em si não tem ação direta, sendo a atividade antibacteriana do nitrito atribuída à formação de peroxinitrito e óxido nítrico produzidos a partir do nitrito (SHAKIL et al, 2022). O nitrito se liga ao ferro, reduzindo sua disponibilidade, essencial para a atividade enzimática e o metabolismo bacteriano. Devido à alta reatividade do ferro e do nitrito, os centros de íons heme das enzimas e os complexos ferro-enxofre são os principais alvos do nitrito. A catálise ácida pode levar à autooxidação da oximioglobina, gerando radicais superóxido. A interação do óxido nítrico com radicais superóxido, assim como a reação do nitrito com peróxido de hidrogênio, pode produzir peroxinitrito (MAJOU & CHRISTIEANS, 2018; SHAKIL et al, 2022). Em ambientes fisiológicos, o peroxinitrito e o ácido peroxinitroso

permanecem em equilíbrio. Esses compostos são fortes oxidantes e agentes nitrantes, que penetram nas células bacterianas por difusão aniônica passiva, interrompendo as atividades metabólicas dos microrganismos e causando oxidação de proteínas e lipídios ou danos ao DNA celular (PROLO et al, 2014; SHAKIL et al, 2022). Cabe ressaltar que alguns microrganismos, como as bactérias lácticas também são produtoras de peróxido de hidrogênio, sendo que sua presença em produtos cárneos poderia favorecer a formação de peroxinitrito. O óxido nítrico (NO) também pode inibir o crescimento microbiano ao formar complexos de ferro dinitrosil ligados a proteínas, quando reage com proteínas ferro-enxofre, que estão envolvidas em atividades fisiológicas críticas, como metabolismo energético e síntese de DNA (LANDRY et al, 2011; SHAKIL et al, 2022;).

É importante destacar que os microrganismos presentes em produtos cárneos possuem diferentes vias metabólicas e estratégias de defesa, sendo que alguns destes microrganismos são resistentes ao estresse oxidativo causado pelo peroxinitrito e pelo ácido peroxinitroso (MAJOU & CHRISTIEANS, 2018; SHAKIL et al, 2022;). Além disso, a ação antibacteriana do nitrito tem se mostrado mais eficaz contra bactérias anaeróbicas Gram-positivas do que contra bactérias aeróbicas Gram-negativas (SHAKIL et al, 2022).

Ao avaliar as concentrações de nitrito usadas atualmente pela indústria de alimentos na elaboração de produtos cárneos curados, a maior parte do nitrito tem a finalidade de controlar a germinação e o crescimento de esporos de *C. botulinum*, sendo necessária apenas uma pequena quantidade, cerca de 25 ppm, para o desenvolvimento da cor. O controle do crescimento de *C. botulinum* e da produção de toxinas botulínicas eleva proporcionalmente com o aumento dos níveis de nitrito. Acredita-se que o nitrito adicionado nos produtos cárneos tenha um impacto maior na inibição de *C. botulinum* do que o nitrito residual durante o armazenamento, sugerindo que a produção de compostos antimicrobianos resultantes de reações relacionadas ao nitrito pode ser significativa durante as etapas de cozimento e resfriamento dos produtos cárneos (LIM et al, 2016; SHAKIL et al, 2022). O crescimento de culturas fermentadoras (*culturas starter*) e a produção de bacteriocina foram reduzidas quando a concentração de nitrito era de 100 ppm em salsichas fermentadas com *Lactococcus lactis*. Ao observar este dado, podemos inferir que os teores de nitrito possuem um impacto direto no metabolismo de *Lactococcus lactis* e que a presença do nitrito poderia impactar na fermentação de salsichas fermentadas (SCANNELL et al, 2001; SHAKIL et al, 2022). Outras estimativas indicam que patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *E. coli* crescem mais lentamente na presença de nitrito em níveis encontrados em produtos cárneos curados e produtos avícolas (MILKOWSKI et al, 2010; SHAKIL et al, 2022).

Mesmo com todos os benefícios que o nitrito pode proporcionar em relação aos aspectos sensoriais do produto cárneo, controle da oxidação e controle microbiológico, seu uso em produtos cárneos é frequentemente questionado. A elevada reatividade química do nitrito, proporciona sua combinação com diversos componentes químicos da carne. Esta elevada reatividade é acelerada quando exposto a elevadas temperaturas, prática comum no processamento de produtos cárneos curados e cozidos. Em condições de pH abaixo de 7 os íons de nitrito são especialmente reativos, podendo interagir com diversos componentes da carne, como aminoácidos, grupos sulfidríla, aminas, compostos fenólicos, ácido ascórbico e mioglobina. O nitrito pode atuar como agente nitrosante, formando vários compostos nitrosos, sendo que outros agentes nitrosantes incluem o ácido nitroso e o óxido nítrico. O ácido nitroso é envolvido nos processos que levam à formação de compostos N-nitrosos endógenos (ZANARDI et al, 2002; SHAKIL et al, 2022). Os compostos N-nitrosos são classificados em seis tipos: N-nitrosaminas não voláteis, N-nitrosaminas voláteis, produtos carboxílicos heterocíclicos N-nitrosados, N-nitrosamidas, compostos de Amadori e glicosilaminas N-nitrosadas (POURAZRANG et al, 2002; SHAKIL et al, 2022).

É consenso que o nitrito pode formar N-nitrosaminas carcinogênicas e outros produtos nitrosados em produtos cárneos (HONIKEL et al, 2008), mas a quantidade de nitrosaminas varia de acordo com o tipo de produto cárneo. Em carnes processadas, por exemplo, a quantidade de N-nitrosaminas pode ser menor que o limite de detecção do método analítico (1 µg/kg). Ressaltando também que as nitrosaminas são formadas quando o alimento é cozido em altas temperaturas ou quando a carne curada é processada (SANCHEZ-ECHANIZ et al, 2001; SHAKIL et al, 2022).

Estudos epidemiológicos recentes sugerem que nitrato, nitrito e compostos N-nitrosos podem representar um risco potencial de câncer (SANCHEZ-ECHANIZ et al, 2001; SHAKIL et al, 2022). Entre esses compostos, a N-nitroso dimetilamina é considerada uma das mais cancerígenas para o corpo humano. Embora o nitrito seja geralmente associado a implicações para a saúde, não há evidências que comprovem uma ligação direta entre o consumo de carnes processadas e o risco de câncer. Apenas a alta exposição a nitritos de diversas fontes tem sido relacionada a um aumento no risco de problemas de saúde (SANCHEZ-ECHANIZ et al, 2001; SHAKIL et al, 2022). Devido a estas evidências, os Estados Unidos e Europa vêm tentando encontrar alternativas para o uso de nitrito e nitrato de sódio (EFSA, 2003).

O nitrito usado em produtos cárneos, pode ser originado de fontes sintéticas ou naturais; o sintético, como o nitrito de sódio e o nitrito de potássio, é bastante usado nas indústrias de carnes pela facilidade, estabilidade e pelo custo, porém as preocupações dos consumidores sobre os aditivos sintéticos e as preferências por alimentos de fontes naturais

e orgânicas vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Portanto, vários estudos têm sido realizados para substituir aditivos sintéticos por produtos naturais. (SEBRANEK & BACUS, 2007).

O nitrito natural é geralmente produzido pela redução nos vegetais do nitrato a nitrito, com a ajuda de bactérias redutoras, como por exemplo o *Staphylococcus carnosus*. Alguns vegetais são conhecidos por terem alto teor de nitrato endógeno, por exemplo, aipo, beterraba, alho poró e alface (SEBRANEK & BACUS, 2007; FLORES & TOLDRÁ, 2021). Com a obtenção desse nitrato de fonte natural, o nível residual do nitrito diminui em comparação aos de fontes sintética, isso acontece porque os vegetais geralmente contêm antioxidantes que promovem a decomposição do nitrito para óxido nítrico. Dessa forma, obter o nitrito de fonte natural, e conseqüentemente diminuir o teor do nitrito residual em produtos cárneos, pode reduzir o risco de formação de nitrosaminas (JO et al., 2020). Apesar de reduzir o potencial risco de formação das nitrosaminas, o uso dessa cura natural ainda é limitado, pelo fato da cor e do sabor dos vegetais afetarem a qualidade sensorial dos produtos de carne curada. Mesmo com o desenvolvimento de extratos vegetais ricos em nitrato e nitrito, até o momento nenhum substituto foi capaz de desenvolver o sabor e aroma característicos da carne curada em produtos cárneos (VASAVADA & CORNFORTH, 2005). Estudos realizados por BROWN et al. (1974) indicam que presuntos curados sem adição do nitrito apresentaram pontuações sensoriais de intensidade de sabor mais baixas ($P < 0,05$) quando comparados aos presuntos curados com 91 ppm e 182 ppm de nitrito.

No Brasil, apesar dos avanços tecnológicos nos processos de produção de produtos cárneos curados, a ocorrência de microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e surtos associados a estes produtos tem chamado à atenção para a sua segurança microbiológica (BRASIL, 2021). Entre os anos de 1999 e 2014, as mortadelas foram implicadas em 15 casos confirmados de botulismo, enquanto as salsichas foram implicadas em nove casos no mesmo período. Estes produtos têm despertado a preocupação dos órgãos regulatórios brasileiros, pois durante o processo de fabricação não há nenhuma etapa que garanta a redução dos esporos de *C. botulinum* presentes, apesar da existência do nitrito e nitrato como agentes inibitórios da germinação durante a estocagem do produto final (BRASIL, 2021). Outro fator que se destaca é o volume de produção destes produtos, sendo as linguiças (1230.210 toneladas), as salsichas (918.252 toneladas), as mortadelas (587.643 toneladas) e presuntos/apresentados (235.089 toneladas) segundo dados da Datamark (2024).

Em 2013, após o último surto de *C. botulinum* envolvendo mortadelas no estado de Santa Catarina (SC), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) iniciou um trabalho de monitoramento neste produto e publicou em 2015 o Ofício-Circular nº

005/2015/CGI/DIPOA/DAS (BRASIL, 2015) que estabelece os seguintes requisitos: a) o produto possua atividade de água (*aw*) máxima de 0,955; b) o processo de cozimento seja validado por profissional competente e que assegure, no mínimo, a redução de seis ciclos logarítmicos (6D) do *Streptococcus D* (*Enterococcus faecium*); c) o prazo de validade não exceda 60 dias; d) o plano APPCC da empresa inclua, na análise de perigos, o *C. botulinum* nas etapas do processo, estabelecendo medidas de controle adequadas; e e) a solicitação de registro atenda as demais legislações pertinentes.

2.2.2. A Mortadela estável em temperatura ambiente

Conforme a Instrução Normativa SDA nº 4, de 31/03/2000 que trata sobre o Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS), de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. (BRASIL, 2000), define-se mortadela como “produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão das carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado”. Dentre os tipos de mortadela, podemos destacar a mortadela produzida com carne de diferentes espécies de animais de açougue, Carnes Mecanicamente Separadas (CMS) (até o limite máximo de 60%); miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue (Estômago, Coração, Língua, Fígado, Rins, Miolos), pele e tendões (no limite máximo de 10%) e gorduras.

A CMS é uma matéria-prima com elevada carga microbiana devido a sua composição rica em nutrientes e etapas tecnológicas durante o processo de desossa mecânica. Uma pesquisa realizada com amostras de CMS estocadas a 7°C apresentou contagens de 4 log UFC/g de *Clostridium* spp. (KUMAR et al., 1976). Sendo a CMS a matéria-prima cárnea predominante na mortadela, os padrões microbiológicos desta influenciam diretamente na qualidade do produto.

O tratamento térmico aplicado durante a produção de produtos cárneos é relativamente brando. Utilizam-se temperaturas inferiores a 100°C em pressão atmosférica normal. Este método inativa as enzimas e destrói os microrganismos sensíveis a temperaturas mais elevadas, sem modificar o valor nutritivo e as características sensoriais do alimento, permitindo apenas o prolongamento da sua vida útil. Caso o produto esteja contaminado por esporos do *C. botulinum*, esse tratamento térmico não seria eficiente para a eliminação deles. Durante o período de estocagem das mortadelas comerciais estáveis em temperatura ambiente, consta em sua rotulagem a temperatura entre 22 e 25°C por até 60 dias de validade. Esta temperatura permite a germinação, o crescimento e a produção de toxinas do *C. botulinum* (FELLOWS, 2009)

Desta forma, o conhecimento dos parâmetros intrínsecos e extrínsecos de produtos cárneos, assim como o estudo de novas tecnologias e ingredientes, pode propiciar o uso de métodos combinados de conservação. Entre estes métodos podemos citar a atividade de água, a qual possui uma faixa limitante na germinação dos esporos de *C. botulinum* e a adição de sais de sódio ou potássio, como por exemplo, o nitrito e nitrato, que atuam na inibição da germinação dos esporos de *C. botulinum* e nos aspectos sensoriais dos produtos cárneos curados (GELLI et al., 2002; LIDON & SILVESTRE, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a prevalência de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas em massas cruas de mortadelas estáveis em temperatura ambiente produzidas no Brasil e avaliar o impacto do uso de nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e do extrato de acerola na inibição de *Clostridium sporogenes* em mortadelas estáveis em temperatura ambiente.

3.2. Objetivos específicos

- a) Determinar a prevalência de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas em massas cruas de mortadela estáveis em temperatura ambiente produzidas no Brasil
- b) Isolar e identificar os esporos de bactérias anaeróbias mesófilas presentes em massas cruas de mortadela estáveis em temperatura ambiente produzidas no Brasil.
- c) Avaliar *in vitro* a susceptibilidade dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas presente em massas de mortadela quanto aos obstáculos presentes em mortadelas estáveis em temperatura ambiente.
- d) Avaliar o impacto da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e do eritorbato de sódio por extrato de acerola no crescimento de *C. sporogenes* em mortadela estável em temperatura ambiente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a organização geral dos temas propostos neste trabalho, todas as atividades realizadas foram divididas em duas etapas, sendo elas:

Etapa I. Prevalência, caracterização e identificação molecular dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas a partir de massas cruas de mortadela produzidas no Brasil

- Avaliação do método analítico para determinação de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias
- Detecção de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias em massas cruas de mortadelas produzidas no Brasil
- Isolamento, caracterização bioquímica e identificação molecular dos esporos de bactérias mesófilas anaeróbias
- Avaliação da susceptibilidade dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas de mortadelas comerciais frente aos principais obstáculos usados em produtos cárneos curados e cozidos

Etapa II. Avaliação da segurança microbiológica da substituição do nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola em mortadela estável em temperatura ambiente

- Aquisição dos extratos vegetais comerciais de nitrito e de acerola
- Avaliação antimicrobiana *in vitro* da eficácia da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola
- Avaliação da segurança microbiológica da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola em mortadela estável em temperatura ambiente durante seu armazenamento

Todas as atividades descritas nas etapas I e II foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC), pertencente ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital), localizado na cidade de Campinas/SP.

4.1. Microrganismos e condições de cultivo

Em todas as atividades deste projeto foram usadas como referência as culturas de *C. sporogenes* (PA3679, ATCC3584 e ATCC11437). Para tanto, as culturas foram ativadas transferindo-se uma alíquota de 1 mL da solução de esporos armazenada em jarro de anaerobiose em geladeira ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) para um tubo contendo 10 mL de Meio Tioglicolato (TGM) e este tubo foi incubado em estufa BOD regulada a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24h em jarros de anaerobiose.

4.1.1. Produção de esporos

As soluções de esporos foram preparadas inoculando-se 10 μL da cultura ativa em 10 mL de caldo Trypticase-Peptona-Glicose-Extrato de Levedura (TPGY) (50 g triptona, 20 g extrato de levedura, 5 g peptona, 6 g dextrose e 1g tioglicolato de sódio, em 1L de água destilada), seguida de incubação em anaerobiose a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após a incubação, uma alíquota de 1 mL deste caldo foi transferida para 100 mL de caldo TPGY e incubada nas mesmas condições descritas anteriormente. A seguir, uma alíquota de 10 mL deste caldo foi transferida para 1 L de caldo TPGY e incubado a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após, a cultura foi centrifugada a 14.000 RPM, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 min, seguida por três lavagens sucessivas em solução salina a 0,85 %. O precipitado foi ressuspensionado em 100 mL do meio de esporulação (60 g triptona, 1 g dextrose e 1 g de tioglicolato de sódio suplementado com 5 g carbonato de cálcio em 1 L de água destilada, pH 5,0) e, em seguida, este foi incorporado em 900 mL de meio de esporulação e incubado sob anaerobiose a 32°C por 10 dias. Ao final, a cultura foi centrifugada a 14.000 RPM, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 min e o precipitado ressuspensionado em 100 mL de solução tampão (Na_2HPO_4 5.675g, KH_2PO_4 3,63g em 1L de água destilada, pH 7,0) (MAH et al., 2009). Durante este projeto foram preparadas duas soluções de esporos contendo 300mL cada, sendo preparadas e usadas nas Etapas I e II. As soluções de esporos foram mantidas na solução tampão e armazenada $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2. Quantificação e padronização da cultura de esporos

Após a produção da solução de esporo, esta foi submetida a choque térmico a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 min seguido por imersão em banho de gelo por 5 min. Foi realizada a diluição decimal seriada da solução de esporos e transferida uma alíquota de 1 mL de cada diluição em placas de Petri estéreis. Em cada placa de Petri foram transferidos aproximadamente 20 mL de ágar Tryptose Sulfito Cicloserina (TSC), homogeneizado oito vezes em formato de oito e, após sua solidificação foi adicionada uma sobrecamada de ágar TSC. Após a solidificação, as placas foram incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após o período de incubação, placas que apresentaram entre 20 e 200 colônias foram selecionadas para contagem e o resultado expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) (SALFINGER & TORTORELLO, 2015).

4.2. Etapa I: Prevalência, caracterização e identificação molecular dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas a partir de massas de mortadela produzidas no Brasil

A quantificação de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias foi realizada conforme preconizado pela APHA (FRANK e YOUSEF, 2004) para amostras de leite fluido e queijo, adaptado para a análise de massas de mortadela estável em temperatura ambiente conforme descrito na letra b do item 4.2.1.

4.2.1. Avaliação do método analítico para determinação de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias

a). Padronização do inóculo nas massas de mortadela

O ajuste da concentração da solução de esporos a ser inoculada nas amostras foi calculado conforme a equação:

$\text{Concentração de esporos na massa} = \frac{\text{Concentração da solução de esporos (UFC/mL)}}{\text{Peso da amostra (g)}}$

b) Inoculação artificial do *pool* de esporos de *C. sporogenes* em massas de mortadela

Para a avaliação dos métodos analíticos selecionados foram usadas massas de mortadela não tratadas termicamente (cruas) e refrigeradas. Estas massas foram produzidas na planta piloto do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e foram analisadas em até 20 min após sua obtenção.

Vinte porções de 50 g de massas cruas de mortadela foram acondicionadas em bolsas estéreis. Foram inoculados 50 µL da diluição da solução de esporos 10⁶ UFC/mL em dez amostras (concentração final de esporos de 10³ UFC/g) e nas outras dez amostras foram inoculados 5 µL da diluição 10⁵ UFC/mL da solução de esporo (concentração final de esporos de 10 UFC/g). Após a inoculação, foi realizada a homogeneização dos inóculos nas massas realizando-se movimentos verticais com as mãos na parte externa das bolsas contendo as amostras. O método de homogeneização escolhido levou em consideração a dificuldade de distribuição uniforme do inóculo em uma amostra com característica de alta viscosidade, tendo em vista que este procedimento é fundamental para permitir a execução correta das demais etapas de análise.

c) Detecção de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias

Em cada amostra inoculada artificialmente pelo *pool* de esporos de *C. sporogenes* foram adicionados 450 mL de água peptonada a 0,01 % seguindo-se para a homogeneização da amostra em *Stomacher* (Bioscience International, EUA) por 60 seg. A seguir, as bolsas foram transferidas para um banho maria regulado a 85 °C ± 1 °C e a

temperatura das amostras foi monitorada usando um termômetro acoplado em uma amostra adicional. O volume da água do banho foi controlado garantindo que o conteúdo das amostras permanecesse submerso. Quando a amostra monitorada atingiu a temperatura de 79 °C, o banho foi regulado a 80 °C ± 1 °C e foi iniciada a contagem do tempo de tratamento térmico por 12 min. Ao final, as amostras foram imediatamente resfriadas em banho de gelo por 5 min.

Foram selecionadas três diluições de acordo com o nível de contaminação estimado para as amostras e transferidos 10 mL da primeira diluição em uma série de três tubos de caldo de Carne Cozida (CMM) em concentração dupla e 1 mL da primeira diluição em três tubos de caldo CMM em concentração simples, procedendo da mesma forma para as demais diluições. Nos tubos inoculados, foram adicionados 5 mL de ágar selo 1 % e, após a completa solidificação do ágar, os tubos foram incubados a 35 °C ± 1 °C por 24 h. Para a leitura dos resultados observou-se a presença de bolhas próximas da região do ágar selo ou o rompimento dele. Os resultados foram expressos em Número Mais Provável (NMP) por grama (NMP/g), após comparação com a tabela de cálculo de NMP disponibilizada pelo *Bacteriological Analytical Manual* – BAM (BLODGETT, 2006). Esta técnica de inoculação proporcionou um limite mínimo de detecção de 0,3 NMP/g.

4.2.2. Detecção de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias em massas cruas de mortadelas comerciais

a) Coleta das amostras

As amostras de massas de mortadela crua industrial foram solicitadas para plantas processadoras de produtos cárneos cozidos localizadas em diferentes regiões do Brasil. A solicitação foi realizada por intermédio da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a qual é a entidade representante do segmento industrial de empresas processadoras de produtos cárneos. Junto com a solicitação foi encaminhado para as plantas processadoras um formulário padronizado para a descrição de informações sobre o produto e o processo de fabricação. As massas cruas de mortadela usadas nesta etapa do projeto foram provenientes de mortadelas que são comercializadas em temperatura ambiente. Estas amostras foram coletadas por um funcionário da empresa responsável pela produção da mortadela após a etapa de embutimento em tripa impermeável e antes da etapa de cozimento. Estas amostras foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo reciclável e imediatamente transportadas ao CTC/Ital. No momento do recebimento foi realizada a aferição da temperatura nas amostras e foram consideradas aptas para análise as amostras que apresentaram temperatura entre 0°C e 4°C. Foi recebido e analisado um

total de 57 amostras de massas cruas de mortadelas provenientes de quatro empresas de médio e grande porte localizadas nos estados de São Paulo e Santa Catarina (Tabela 5).

b) Quantificação de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias

A quantificação de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas foi realizada conforme preconizado pela *American Public Health Association* – APHA (FRANK e YOUSEF, 2004) para amostras de leite fluido e queijo e adaptado para a análise de massas de mortadela, substituindo o Meio Reforçado para Clostrídios (RCM) pelo Caldo de Carne Cozida (CMM), conforme descrito e avaliado na letra c do item 4.2.1. Os resultados foram expressos em Número Mais Provável por grama (NM/g) e posteriormente convertidos em número logarítmico para análise estatística.

4.2.3. Isolamento, caracterização bioquímica e identificação molecular dos isolados de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias

a) Isolamento de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias

A partir das amostras de massas cárneas cruas e comerciais de mortadela previamente analisadas foram obtidos tubos de ensaio com crescimento positivo. Os tubos de caldo CMM correspondentes à mesma amostra tiveram seu conteúdo transferido assepticamente para tubos tipo Falcon, os quais foram submetidos à centrifugação (10.000 RPM por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 40 mL de caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) adicionado de 15% de glicerol. Após homogeneização em vortex foram distribuídos 20 mL do material em quatro criotubos estéreis e estes foram congelados em biofreezer a $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os 20mL restantes foram mantidos em refrigeração ($6\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento do uso. A partir dos tubos tipo Falcon contendo o material concentrado, foi retirada uma alíquota de 2 mL de cada tubo, referente à triplicata de amostras do mesmo lote, e esta foi transferida para um único tubo de ensaio estéril onde recebeu uma codificação.

b) Purificação das culturas

Alíquotas de 1 mL dos isolados provenientes das triplicatas de amostras concentradas foram plaqueadas em profundidade em ágar TSC. Após a solidificação do ágar foi adicionada uma sobrecamada do mesmo meio e, após a solidificação desta, as placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Foi observado o desenvolvimento de colônias características com aspecto circular e coloração preta. Com o auxílio de uma alça tipo agulha foi realizada a transferência de um número mínimo de cinco colônias típicas para tubos de ensaio contendo caldo BHI. Estes foram incubados em condições similares às mencionadas anteriormente e, a seguir, alíquotas de 1 mL foram retiradas e transferidas para tubos tipo Eppendorf, mantidos a $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$.

c) Caracterização morfológica e bioquímica das culturas isoladas

A caracterização das culturas isoladas a partir de massas cruas de mortadela comerciais foi realizada por meio de testes bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, conforme SILVA et. al. (2017). Devido ao alto risco na manipulação de culturas padrões de *C. botulinum* e ausência de um laboratório com nível de segura BLS3 (Biosafety Level 3), foi usada a cultura de *C. sporogenes* PA 3679, que possui similaridade genética com o *C. botulinum*, como cultura indicadora (controle positivo). As análises bioquímicas e morfológicas foram realizadas a fim de reduzir o número de culturas isoladas para a identificação molecular pela técnica de PCR.

Determinação morfológica

A partir do tubo de caldo BHI foi realizada a coloração de Gram para avaliação da morfologia das culturas. Uma alçada do caldo BHI foi transferida para uma lâmina de vidro, esta foi fixada em bico de Bunsen e, após resfriamento, esta foi coberta com 1 mL da solução de cristal violeta durante 1 min. A seguir, foi realizada uma lavagem em água corrente e foi acrescentado 1 mL de solução de Lugol durante 1 min. Foi realizada uma lavagem com álcool etílico 98 °GL seguida de lavagem em água corrente durante 30 seg. Foi adicionado 1 mL de solução de safranina durante 20 seg e realizada uma nova lavagem em água corrente. As lâminas foram dispostas em papel de filtro para secagem e estas foram visualizadas em microscópio com lente objetiva de 100 X e óleo de imersão. Durante a microscopia foram observados o formato das células e sua coloração. As cepas de *C. sporogenes*, assim como as cepas de *C. botulinum*, são bastonetes Gram positivas.

Teste de catalase

A partir do tubo de caldo BHI foi transferido 0,1 mL para uma lâmina de vidro e acrescentado 0,1 mL da solução de peróxido de hidrogênio a 30 %. Foi observada a reação de efervescência (resultado positivo) ou não (resultado negativo). O objetivo do teste foi avaliar a capacidade das culturas isoladas em produzir a enzima catalase. As cepas de *C. sporogenes*, assim como as cepas de *C. botulinum*, não apresentam a enzima catalase.

Teste de redução do nitrato e motilidade

Com o auxílio de uma alça de inoculação tipo agulha, as culturas contidas nos tubos de caldo BHI foram inoculadas por picada em tubos contendo o ágar Nitrato Motilidade (NM) até uma profundidade de 1 cm do fundo e estes foram incubados a 35 °C ± 1 °C por 24 h. Para a leitura do teste de motilidade foi observado se houve migração de células para regiões fora da linha de inoculação (motilidade positiva), ou se o crescimento se restringiu à região da picada (motilidade negativa). Para a realização do teste de redução do nitrato, foi adicionado 0,1 mL dos reagentes de nitrato (A = solução de 0,8 % de ácido

sulfanílico; B = solução 0,5 % de alfa-naftol). Foi observado imediatamente se houve o desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura (teste positivo) e, nos tubos negativos, foi adicionado uma pitada de pó de zinco ao meio e verificado se houve a alteração de cor. Os tubos que não tiveram a cor do meio alterada após adição do pó de zinco foram considerados positivos. As cepas de *C. sporogenes*, assim como as cepas de *C. botulinum*, possuem motilidade variável e reduzem o nitrato.

Teste de fermentação da lactose e hidrólise da gelatina

A partir dos tubos de caldo BHI foi inoculada uma alçada em tubos de meio de Lactose Gelatina (LG) e estes foram incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após a incubação foi verificada a fermentação da lactose pela presença de bolhas e alteração da cor do meio de vermelha para amarela (teste positivo). Posteriormente, os tubos foram transferidos para geladeira por duas horas e foi observado se o meio continuava líquido (teste de hidrólise da gelatina positivo) ou se este adquiriu uma consistência firme (teste de hidrólise da gelatina negativo). As cepas de *C. sporogenes*, assim como as cepas de *C. botulinum*, não fermentam lactose, porém hidrolisam a gelatina.

Teste de produção de lipase e lecitinase

A partir dos tubos de caldo BHI foram realizadas estrias de esgotamento em ágar TSC suplementado com 0,8 % de solução de gema de ovo (1:1), seguidas de incubação a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. No teste de lecitinase foi observado o desenvolvimento de um halo de precipitação ao redor da colônia, indicando a reação de lecitinase com a gema do ovo (teste positivo) ou o não desenvolvimento do halo de precipitação (teste negativo). Para o teste de lipase foi observado o desenvolvimento de uma camada lipídica e com brilho ao redor da colônia (teste positivo) ou verificada a opacidade da colônia (teste negativo). As cepas de *C. sporogenes*, assim como as cepas de *C. botulinum*, produzem a enzima lipase, porém não a lecitinase.

Crescimento em aerobiose

Foi realizado o teste de crescimento aeróbio, que consistiu em realizar o esgotamento das culturas em meio TGM adicionado de 1 % de ágar e incubação em aerobiose a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Foi observado se houve a turvação do meio de cultura (teste positivo), indicando o crescimento em aerobiose, ou se o meio de cultura permaneceu inalterado (teste negativo).

Produção de esporos

Foi verificada a capacidade de produção de esporos de acordo com o método de esporulação de MAH et. al (2009). Após, a solução de esporos foi submetida a choque-térmico a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, no qual se removeu as células vegetativas presentes.

Uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para uma lâmina de microscópio limpa e realizada a coloração de esporos segundo SILVA et. al. (2017). As lâminas foram dispostas em papel de filtro para secagem e estas foram visualizadas em microscópio com lente objetiva de 100 X e óleo de imersão. Durante a microscopia foram observados o formato das células e sua coloração. Os esporos possuem a coloração verde, enquanto as células vegetativas apresentam coloração rosa.

d) Identificação molecular de *C. sporogenes*

Para a identificação de *C. sporogenes* dentre as culturas isoladas foi usada a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Para tanto, foram selecionados os primers, com base nos estudos realizados por Cremonesi et al (2012) e De Medici (2009), IAC (controle interno), *colA* (colagenase), IOA (toxina botulínica A), CBMLB (toxina botulínica B), CBMLE (toxina botulínica E) e CBMLF (toxina botulínica R).

Tabela 1. Primers utilizados para amplificação por PCR neste estudo.

Primer		Sequência do Primer (5'–3')	Pb
IAC	foward	CGGCTTCATTAGAGAACGGACGTTTGGTATGGCTTCATTC	698
	reverse	TAACCCCCTAGCCCCGTATTAGACGTCAGGTGGCACTTT	
<i>colA</i>	foward	TTGGGATTTTGGGGATAACA	549
	reverse	TCCGTATCGTTGTCGTCTTG	
IOA	foward	GGGCCTAGAGGTAGCGTARTG ^a	101
	reverse	TCTTYATTTCCAGAAGCATATTTT ^b	
CBML B	foward	CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA	205
	reverse	CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG	
CBML E	foward	CCAAGATTTTCATCCGCCTA	389
	reverse	GCTATTGATCCAAAACGGTGA	
CBML F	foward	CGGCTTCATTAGAGAACGGA	543
	reverse	TAACCCCCTAGCCCCGTAT	

^a R = C ou T; ^b Y = A ou G.

Os primers de toxinas botulínicas foram selecionados e avaliados nesta etapa como medida de segurança para garantir que as culturas previamente isoladas (CP5, JP2 e OP2) não apresentassem genes de produção de toxina e fossem consideradas seguras para os testes de desafio.

Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o método de lise térmica adaptado de VAN SOOLINGEN et al. (1991). A partir dos tubos de caldo BHI, foi realizada a extração do DNA bacteriano das culturas transferindo-se uma alíquota de 1mL para tubos tipo Eppendorf de 2mL e centrifugado a 10.000 RCF por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Ao precipitado foram adicionados 100 µL de água deionizada estéril e esta suspensão foi homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta. Os tubos foram

submetidos ao congelamento a $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min, após aquecimento em banho seco a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Os DNAs bacterianos foram estocados a $-20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da amplificação.

Amplificação e eletroforese do DNA

Foram preparadas duas amplificações, sendo a primeira para o gene target *colA* e a segunda uma reação multiplex para os genes target IAC (controle interno), IOA (toxina botulínica A), CBMLB (toxina botulínica B), CBMLE (toxina botulínica E) e CBMLF (toxina botulínica R). Para cada reação de amplificação foi preparada uma solução mix com volume final de $100\mu\text{L}$, a qual continha: 2U de Taq DNA Polimerase (Sigma-Aldrich, EUA), $0,2\text{mM}$ de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 50mM de Tris-HCl, 10mM KCl, 50mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2mM MgCl_2 e $1\mu\text{M}$ de cada *primer* específico para cada gene. Em seguida, $5\mu\text{L}$ de DNA extraído foi adicionado a $45\mu\text{L}$ do mix. Como controle negativo da reação foram usados os reagentes adicionados de água deionizada. A amplificação dos fragmentos de DNA dos genes IAC, IOA, CBMLB, CBMLE, e CBMLE foi realizada em termociclador (Proflex, Applied Biosystem, EUA), incluindo-se a desnaturação a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, seguida de 30 ciclos a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, anelamento a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, extensão a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min e a extensão final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Para o gene *colA* foi realizada a desnaturação a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min, seguida de 30 ciclos a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, anelamento a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min, extensão a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 min e a extensão final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a $1,5\%$ (p/v) em tampão TAE 1X a 100V por 90min, corados em solução de Brometo de Etídio (10ng/mL) e visualizados em fotodocumentador (PhotoDoc-It, UVP, EUA). O padrão de peso molecular (ladder) de 100pb foi usado para a eletroforese.

4.2.4. Avaliação in vitro da susceptibilidade dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas de mortadelas comerciais frente às principais barreiras usadas em produtos cárneos curados e cozidos

a) Padronização das culturas de clostrídios

Para padronização das soluções de esporos foi usada a metodologia descrita por ALNOMAN et al. (2015). A partir das suspensões de esporos dos microrganismos identificados e do *C. sporogenes* PA3679 foi transferida uma alíquota de 1 mL de cada suspensão para um tubo de ensaio e ajustada a concentração com água deionizada no espectrofotômetro na densidade óptica (OD) de 630 nm até atingir a faixa entre $0,8$ e $1,0$ de absorvância (equivalente a $1,5 \times 10^8$ esporos/mL).

b) Determinação da curva de germinação dos esporos

A determinação da curva de crescimento foi realizada usando a metodologia descrita por DONG et al. (2007). Para tanto, foram transferidos $100\text{ }\mu\text{L}$ da solução de

esporos das culturas previamente isoladas de massas de mortadela e do controle positivo *C. sporogenes* PA3679 para cada poço de uma microplaca de poliestireno estéril. Em seguida, foram adicionados 100 µL de caldo BHI em concentração dupla nos mesmos poços. O controle do meio de cultura foi preparado inoculando 100 µL do caldo BHI em concentração dupla e 100 µL de água estéril. A microplaca foi incubada a 30 °C ± 1°C por 48 h em câmara de anaerobiose. Foram realizadas leituras em leitora de microplacas (Microplate Reader, Alpac) em períodos pré-determinados e os resultados foram expressos em absorvância. Em paralelo foi realizada avaliação microscópica das culturas usando a técnica de contraste de fase a fim de identificar a porcentagem de germinação dos esporos. Os dados obtidos foram tratados pelo modelo de Gompertz modificado usando o programa DMFit (BARANY & ROBERTS, 1995) para avaliar o período de germinação dos esporos e o tempo de fase lag durante o crescimento dos microrganismos.

c) Verificação da capacidade de germinação dos esporos em diferentes temperaturas

Foram transferidos 100µL da solução de esporos das culturas previamente isoladas de massas de mortadela e dos controles positivos (*C. sporogenes* PA3679) para cada poço de uma microplaca de poliestireno com 96 poços em U, individualizadas para cada cultura, conforme a metodologia descrita na letra b do item 4.2.4. As microplacas foram incubadas nas seguintes condições: 25 °C ± 1 °C e 35 °C ± 1 °C por 48 h e 4 °C ± 1 °C e 10 °C ± 1 °C por 30 d em anaerobiose. Os dados obtidos foram tratados pelo modelo de Gompertz modificado usando o programa DMFit (BARANY & ROBERTS, 1995) para avaliar o período de germinação dos esporos. Em paralelo foi realizada avaliação microscópica das culturas usando a técnica de contraste de fase a fim de identificar a porcentagem de germinação dos esporos.

d) Avaliação do efeito inibitório de agentes químicos, físicos e biológicos na germinação dos esporos

Para a avaliação do efeito inibitório de agentes químicos e físicos na germinação dos esporos foi empregada a metodologia descrita por ALNOMAN et al. (2015). Foram avaliados diferentes valores que representam fatores intrínsecos que controlam a estabilidade microbiológica e físico-química das mortadelas estáveis em temperatura ambiente, como a atividade de água (0,930; 0,940; 0,950; 0,955; 0,960 e 0,970), o pH (3,0; 4,0; 4,6; 5,0; 6,0; 7,0 e 9,0), o nitrito (10; 25; 50; 100; 150; 200; 250 e 300ppm), o eritorbato de sódio (500; 1000; 1500; 2000 e 2500 ppm) e o lactato de sódio (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0%).

Para tanto, foram transferidos 100 µL da solução de esporos das culturas previamente isoladas de massas de mortadela e *C. sporogenes* para tubos contendo 6 mL de caldo BHI em concentração dupla suplementado com o agente químico ou físico na concentração desejada. Os tubos foram homogeneizados em Vortex por 60 seg e uma

alíquota de 1 mL foi usada para leitura inicial da absorbância em leitora de microplacas na OD_{630nm}. Os tubos foram incubados a 30 °C por 48 h em câmara de anaerobiose e, após, uma nova alíquota de 1mL foi retirada dos tubos, realizada leitura na OD_{630nm} e os resultados foram expressos em absorbância.

4.3. Etapa II: Avaliação da segurança microbiológica da substituição do nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola em mortadela estável em temperatura ambiente

A mortadela estável em temperatura ambiente foi selecionada como produto a ser avaliado devido ao estresse térmico deste produto durante a etapa de armazenamento e também pela sua formulação, que permite o uso de 60% de CMS e de miúdos. Cabe ressaltar que devido ao uso de miúdos, os níveis de mioglobina neste produto podem ser superiores aos encontrados em formulações elaboradas somente com carne e este fator pode impactar na quantidade de nitrito que foi ofertada para o processo de cura e o residual de nitrito presente durante a vida útil do produto para auxiliar na manutenção da segurança microbiológica.

4.3.1. Aquisição dos extratos vegetais

Os extratos vegetais comerciais que foram usados neste trabalho foram solicitados a duas empresas de ingredientes multinacionais que atuam no mercado brasileiro. Para a substituição do nitrito foram usados dois extratos vegetais (Aipo e Acelga) que passaram pelo processo de fermentação e conversão do nitrato a nitrito, sendo estes denominados extratos vegetais pré-convertidos. Para a substituição do eritorbato de sódio foi usado um extrato de acerola contendo 16% de ácido ascórbico. Considerando questões de sigilos comerciais, os extratos não receberão seu nome comercial, mas o extrato base usado em sua obtenção.

4.3.2 Avaliação antimicrobiana *in vitro* da eficácia da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido

a) Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Preparo do inóculo

O preparo dos inóculos para os testes de atividade antimicrobiana foi realizado segundo as recomendações do protocolo M11-A8 para bactérias anaeróbias (CLS, 2015). Para tanto, as soluções de esporos foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4 mL de solução salina estéril e homogêneos em agitador tipo Vortex. Alíquotas de 2 mL destas suspensões foram tomadas para leitura em espectrofotômetro a 540nm e ajustadas com solução salina estéril para valores OD_{540nm} de 0,08 a 0,10, correspondentes à concentração de 10⁸ UFC/mL. Aos 2 mL remanescentes das suspensões de esporos, foi adicionado o mesmo volume de solução salina estéril. A partir das soluções padronizadas, foi realizada a diluição decimal seriada de forma a se obter, ao final da mesma, a

concentração de 10^6 UFC/mL. Destas últimas diluições, 6 mL foram transferidos para tubos contendo 3 mL de caldo BHI, estabelecendo-se uma concentração de 10^5 UFC a 10^6 UFC/mL em 100 μ L, sendo que nos poços das microplacas inoculados as concentrações foram de 10^5 UFC/mL.

Preparo das soluções de compostos antimicrobianos

Para a determinação de atividade antimicrobiana das culturas foram preparadas soluções individuais de cada composto, diluídas em caldo BHI em concentração dupla. Foram avaliados os seguintes compostos e concentrações: nitrito (25 ppm, 50 ppm e 150 ppm); eritorbato de sódio (500 ppm); eritorbato de sódio (500 ppm) suplementado com nitrito (25 ppm, 50 ppm e 150 ppm); nitrito obtido a partir de extrato de acelga (25 ppm, 50 ppm e 150 ppm nitrito), nitrito obtido a partir de extrato de aipo (25 ppm, 50 ppm e 150 ppm), sorbato de potássio (2,5 % e 5,0 %) e lactato de sódio (5,0 % e 10,0 %). A partir dos resultados encontrados na avaliação individual de cada composto antimicrobiano foram formulados *blends* com os compostos que apresentaram resultados promissores e foi determinada sua atividade antimicrobiana.

Os valores de atividade de água das soluções dos compostos antimicrobianos foram determinados com medidor de atividade de água Aqualab 4TE (BRASIL, 2019) e o pH foi determinado em pHmetro Digimed DM-23 (BRASIL, 2019) com eletrodo tipo penetração.

Preparo da microplaca

Foram usadas nos testes microplacas com 96 poços de fundo em U, com capacidade de 300 μ L e tampas descartáveis e estéreis. Em cada poço foram adicionados 100 μ L das soluções dos compostos com atividade antimicrobiana. Posteriormente, foram inoculados 100 μ L de cada suspensão de esporos bacterianos. Como controle positivo foram inoculados 100 μ L de caldo BHI sem adição do composto testado e 100 μ L das culturas, enquanto o controle negativo foi preparado com a solução de 100 μ L dos caldos e 100 μ L de água deionizada estéril. As microplacas foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h em anaerobiose. Os testes foram repetidos duas vezes.

Leitura dos resultados

Após o período de incubação foram adicionados 50 μ L da solução reveladora de 0,1% de Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) em cada poço e as placas foram reincubadas em anaerobiose a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 2 h. A atividade antimicrobiana dos compostos foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração rosa, conferida ao meio quando as células apresentam atividade metabólica.

4.3.3. Avaliação da segurança microbiológica da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola em mortadela estável em temperatura ambiente

A partir dos resultados obtidos no teste de avaliação antimicrobiana *in vitro* da eficácia da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido, um extrato vegetal foi selecionado para realização do teste de desafio em mortadela estável em temperatura ambiente. Para tanto, foram seguidos os procedimentos estabelecidos no NACMF (2010).

a) Processamento do lote experimental de mortadela artificialmente contaminada com esporos de *Clostridium sporogenes*

Preparo do “pool” de esporos de *Clostridium sporogenes*

A partir das soluções de esporos de *Clostridium sporogenes* previamente isolados de massas de mortadela e das culturas de referência de *C. sporogenes* (PA3679, ATCC3584 e ATCC11437) foi transferida uma alíquota de 10mL de cada solução para um Erlenmeyer estéril. Este pool de esporos foi submetido a choque térmico a $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 min seguido por imersão em banho de gelo por 5 min e realizada sua quantificação conforme descrito no item 4.1.2. Este pool de esporos foi armazenado sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até o momento do uso.

Caracterização das matérias-primas

Para a caracterização das matérias-primas foram realizados os ensaios de cinzas (BRASIL, 2019), umidade (BRASIL, 2019), proteína (BRASIL, 2019) e gordura (BRASIL, 2019), *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2, 2017), bactérias lácticas (ISO 13721, 1996), clostrídios sulfito redutores (SALFINGER & TORTORELLO, 2015), esporos de clostrídios sulfito redutores (SALFINGER & TORTORELLO, 2015), *Clostridium perfringens* (ISO 7937, 2004) e estafilococos coagulase positiva (ISO 6888-1, 2021).

Processamento das amostras de mortadela

Neste estudo foi usada uma única concentração de nitrito adicionado (150 ppm), eritorbato de sódio (500 ppm), extrato de acerola (1400 ppm), e com três condições de atividade de água sendo: 0,94, limite mínimo na literatura para inibição da germinação e crescimento de *C. botulinum*; 0,970, valor considerado de risco na literatura para a germinação e crescimento de *C. botulinum* e 0,955 atendendo aos parâmetros definidos no ofício circular n.º 005/2015/CGI/DIPOA/DAS (BRASIL, 2015) para produção de mortadelas estáveis em temperatura ambiente. Desta forma, as amostras de mortadela foram elaboradas na planta piloto do CTC/Ital usando uma formulação padrão (Tabela 2) e foram produzidos seis tratamentos, sendo eles:

- CT94: nitrito de sódio (cura tradicional); atividade de água 0,940;
- CT95: nitrito de sódio (cura tradicional); atividade de água 0,955;
- CT97: nitrito de sódio (cura tradicional); atividade de água 0,970;
- CN94: extrato vegetal (cura natural); atividade de água 0,940;
- CN95: extrato vegetal (cura natural); atividade de água 0,955;
- CN97: extrato vegetal (cura natural); atividade de água 0,970.

Tabela 2. Formulação das amostras com a cura tradicional e natural.

Matérias-primas / Ingredientes	Cura Tradicional		Cura Natural	
	%	g	%	g
CMS frango	60,00	9000	60,00	9000
Retalho suíno	15,20	2280	15,20	2280
Fígado suíno	1,00	150	1,00	150
Rim suíno	1,00	150	1,00	150
Gel de pele suína crua (2:1)	12,00	1800	10,96	1644
Proteína texturizada de soja	3,50	525	3,50	525
Fécula mandioca	5,00	750	5,00	750
Sal	*	*	*	*
Açúcar	0,60	90	0,60	90
Condimento mortadela (38% de sal)	1,00	150	1,00	150
Fosfatos	0,50	75	0,50	75
Extrato vegetal de Aipo	-	-	1,00	150
Sal de cura (90% de sal e 10% de nitrito)	0,15	22,5	-	-
Acerola (16% de ácido ascórbico)	-	-	0,24	36
Eritorbato de sódio	0,05	7,5	-	-
TOTAL	100	15000	100	15000

* A quantidade de sal adicionada foi calculada e ajustada após análise de umidade micro-ondas da massa cárnea (Tabela 3).

As matérias-primas cárneas congeladas foram quebradas em quebrador de blocos, e após foram moídas com o CMS em discos de 16 mm. A massa cárnea, a CMS, os miúdos e o gel de pele foram transferidos para o *Blixer® 4 (Robot Coupe, França)* e homogeneizadas. Aproximadamente 50 % da massa cárnea foi inoculada, por meio da técnica de gotejamento usando uma pipeta graduada, com o *pool* de esporos de clostrídios (3 log UFC/g) e os demais 50 % de massa cárnea não inoculadas com os esporos destas bactérias foram usadas como controle dos testes. Foram adicionados o fosfato, o sal de cura e/ou o extrato vegetal, o condimento, a proteína texturizada de soja, a fécula de mandioca e o açúcar e a mistura foi submetida a homogeneização para formação de uma emulsão (Figura 2).

Uma alíquota da massa de cura tradicional e uma outra de cura natural foram retiradas e foi determinada a umidade (% UR) por metodologia rápida (microondas) segundo Pettinati (1975), onde foi possível obter os cálculos para ajustar a atividade de água (A_w) de

cada tratamento, através da adição de NaCl, conforme a equação de Krispien, Rodel e Leistner (1979) modificada.

Equação 1:

$$Aw_{alvo} = [0,99918 + (-0,00726 * CS)] \text{ [Equação 1]}$$

Onde CS é a concentração salina, calculada conforme a Equação 2.

Equação 2:

$$CS(\text{Concentração salina}) = \left(\frac{NaCl (\%) * 100}{NaCl (\%) + Umidade (\%)} \right)$$

Tabela 3. Valores adicionados de cloreto de sódio na massa cárnea após ajuste de Aw.

Teor de sal	Tratamentos					
	CT94	CT95	CT97	CN94	CN95	CN97
%	4,53	3,58	1,75	4,55	3,56	1,72
g*	679,5	537	262,5	682,5	534	258

* Valor calculado considerando 5 Kg de massa cárnea para cada tratamento.

Após adição do cloreto de sódio e o ajuste da atividade de água, a emulsão foi homogeneizada e as amostras dos seis tratamentos foram embutidas em envoltório plástico impermeável e encaminhadas para o cozimento em forno combinado (Rational Combimaster Plus). O regime de cozimento utilizado nessa etapa foi 85 °C até que o interior do produto atingisse 72 °C. Após o cozimento, o produto foi resfriado em água corrente e as amostras foram armazenadas em sala climatizada a 26 °C ± 1 °C com umidade relativa de 80 % por 90 dias.

As amostras de mortadela foram encaminhadas para análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais após 24 h de armazenamento a 26 °C ± 1 °C. Foram produzidos dois lotes experimentais e foi considerada como unidade experimental do estudo uma peça de mortadela com aproximadamente 200 g. Todos os ensaios foram realizados em triplicata de amostras.

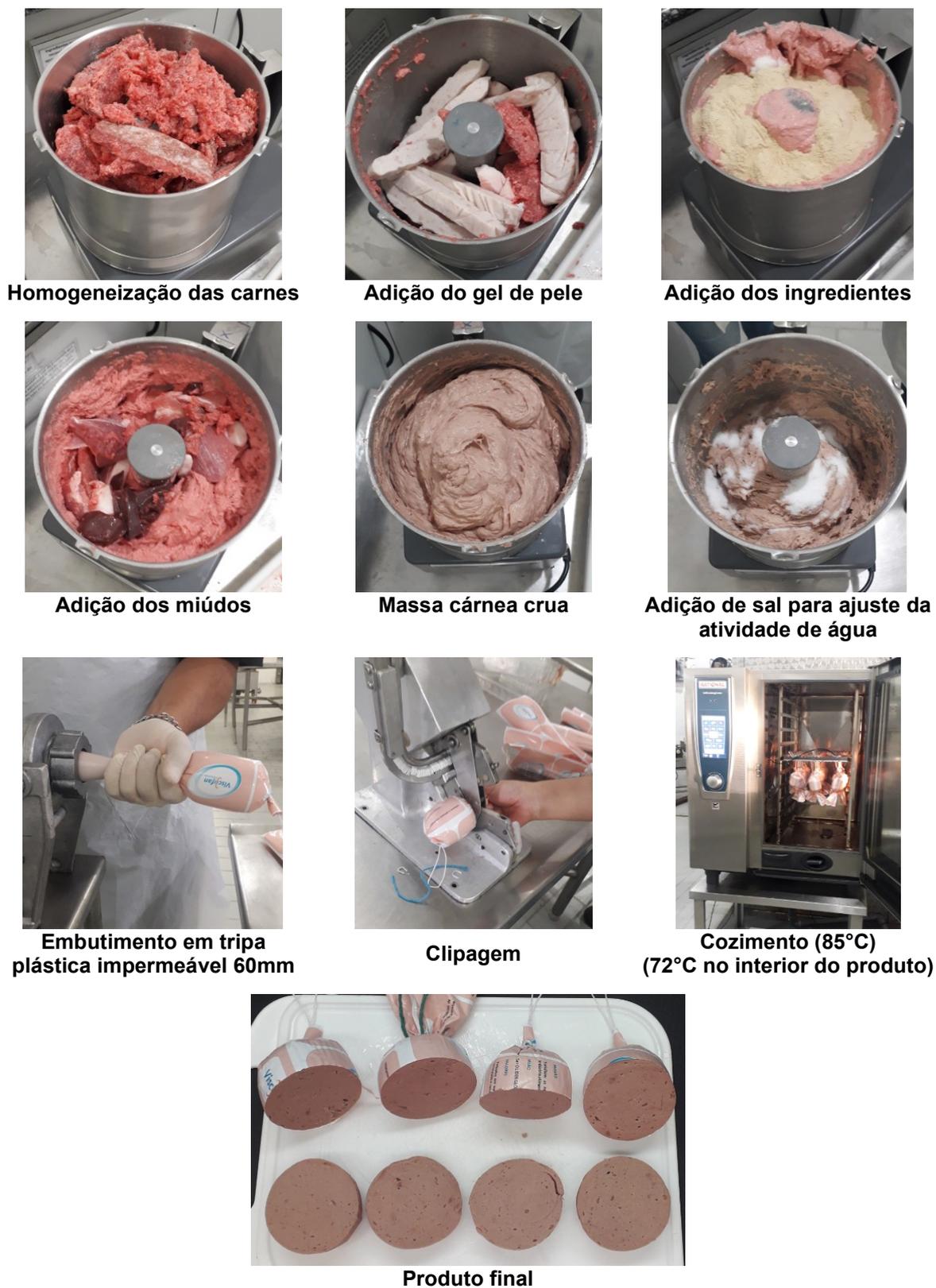


Figura 2. Etapas do processamento do lote experimental.

b) Caracterização físico-química e microbiológica das mortadelas

Após 24 horas de armazenamento, três amostras de mortadela de cada tratamento foram selecionadas para a realização dos ensaios físico-químicos de umidade, proteína, gordura, carboidratos, cinzas, atividade de água, pH, nitrito e nitrato (BRASIL, 2019). Também foram realizados os ensaios de *Salmonella* spp. (ISO 6579-1, 2020), *Escherichia coli* (ISO 16649-2, 2001), *Clostridium perfringens* (ISO 7937, 2004) e estafilococos coagulase positiva (ISO 6888-1, 2018) conforme preconizados na Instrução Normativa nº 161 de 1º de julho de 2022 (BRASIL, 2022). Com o objetivo de avaliar as características sensoriais, também foram realizados os ensaios de cor objetiva e perfil de textura conforme descritos abaixo.

As atividades da Etapa II deste projeto foram realizadas entre junho de 2021 e maio de 2022, período afetado pela Pandemia de Covid-19. Sendo assim, não foi possível a realização de avaliações sensoriais com provadores. Com o objetivo de caracterizar o produto foram realizados os ensaios de cor objetiva $L^*a^*b^*$ e perfil de textura.

A análise de cor objetiva foi realizada utilizando espectrofotômetro portátil Minolta Chroma Meter 508D (Minolta Camera Co., Japan), previamente calibrado em superfície branca (Figura 3a). Os parâmetros avaliados foram L^* (luminosidade), a^* (intensidade de vermelho/verde) e b^* (intensidade de amarelo/azul). A análise foi realizada em cinco replicatas de análise.

O perfil de textura foi realizado no equipamento Texture Analyser TA-XT2i. com o probe acoplado, as amostras de mortadela foram padronizadas com diâmetro de 1,5 cm por 1,5 cm de altura, foram feitas oito repetições para cada formulação de mortadela (Figura 3b). Para a determinação do perfil de textura foram analisadas as propriedades de dureza, elasticidade, coesividade, gomosidade e mastigabilidade.

a)



b)



Figura 3. Análises instrumentais em mortadela. **a)** Espectrofotômetro portátil Minolta Chroma Meter 508D e **b)** Texturômetro Texture Analyser TA-XT2i

c) Acompanhamento da vida útil das mortadelas

No 15º, 30º, 45º, 60º, 75º e 90º dia de armazenamento foram realizados os ensaios de bactérias lácticas (ISO 13721, 1996), clostrídios sulfito redutores (SALFINGER & TORTORELLO, 2015), nitrito (BRASIL, 2019) e nitrato (BRASIL, 2019). Os ensaios foram realizados em triplicata de amostras. Os resultados microbiológicos foram expressos em log UFC/g e os resultados de nitrito e nitrato em g/100g.

4.4. Análise estatística

Os resultados de caracterização das mortadelas (24 h) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) simples (*One Way*) e a diferença significativa entre as médias foi determinada com o teste de Tukey com 95% de significância. Nos resultados dos ensaios microbiológicos foram avaliados o efeito do tratamento e da interação tratamento X tempo, quando presentes na etapa analisada. A diferença entre as médias para os efeitos significativos ($p < 0,05$) foram comparadas pelo teste de Tukey. Foi usado o programa Statística 10

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de esporos

O método de esporulação de MAH et al. (2009) possibilitou a obtenção de contagens consideráveis de esporos das quatro culturas de *Clostridium*: $5,4 \times 10^7$ UFC/mL de *C. sporogenes* PA3679; $2,5 \times 10^7$ UFC/mL de *C. sporogenes* ATCC3584; $1,7 \times 10^7$ UFC/mL de *C. sporogenes* ATCC11437, e $1,6 \times 10^7$ UFC/mL de *C. sporogenes* ATCC19404. De acordo com esta metodologia o tempo de obtenção dos esporos é relativamente longo (18 dias). No entanto, as concentrações elevadas de esporos obtidas possibilitaram a inoculação das massas cruas de mortadela para determinar a eficiência dos testes de determinação de esporos de mesófilos anaeróbios, os estudos de avaliação *in vitro* e o teste de desafio na mortadela.

5.2. Etapa I: Prevalência, caracterização e identificação molecular dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas a partir de massas de mortadela comerciais

5.2.1. Avaliação do método analítico para determinação de esporos de mesófilos anaeróbios

Na determinação da concentração de esporos de mesófilos anaeróbios nas massas cruas de mortadela que foram artificialmente inoculadas pelo *pool* de esporos, constituído pelas três espécies de *C. sporogenes*, verificou-se que a metodologia empregada foi eficaz para a recuperação dos esporos nesta matriz cárnea (Tabela 4). Desta forma, constatou-se que as concentrações dos esporos inoculados foram recuperadas pelo método empregado. Observou-se pela análise da amostra controle que as massas cruas não apresentavam contaminação natural por esporos antes de sua inoculação. As baixas concentrações de esporos inoculadas nas amostras com concentrações de 10^1 UFC/g foram recuperadas satisfatoriamente, o que evidencia que os métodos poderão ser usados em amostras em que se prevê a obtenção de um número reduzido de esporos. Considera-se que a prevalência de esporos de *C. botulinum* em carnes e produtos cárneos é inferior a 10 % e a carga de esporos geralmente se apresenta em números muito baixos, inferiores a 10 UFC/g (GLASS & MARSHALL, 2013).

Tabela 4. Resultados de esporos de mesófilos anaeróbios das massas artificialmente inoculadas

Amostras	Esporos de mesófilos anaeróbios (NMP/g) ^a		
	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3
1 ^b	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
1 ^b	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
2 ^c	3,6	3,6	3,6
2 ^c	3,6	3,6	3,6
Controle ^d	<0,3 ^e	<0,3 ^e	<0,3

^a Número Mais Provável por grama; ^b Concentração inicial: 10^3 UFC/g; ^c Concentração inicial: 10^1 UFC/g;

^d Massa crua de mortadela sem adição de inóculo; ^e Limite de detecção do método

5.2.2. Detecção de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias em massas cruas de mortadelas comerciais

Foi analisado um total de 57 amostras de massas cruas de mortadelas (Tabela 5) e em 75% destas amostras foi confirmada a presença de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas. Em um total de 1,8 % dessas massas cruas de mortadelas verificou-se contagens superiores a $1,0 \times 10^2$ NMP/g, nas demais amostras as contagens foram reduzidas, entre 0,3 NMP/g e $1,5 \times 10^1$ NMP/g.

Tabela 5. Contagens de esporos de mesófilos anaeróbios das massas cruas de mortadela analisadas.

Empresa	Amostra	Formulação					Esporos de mesófilos anaeróbios (NMP/g) ^a
		MP ^b	CMS (%)	Amido/ Fécula	Aw	Nitrito (ppm) ^c	
A	A	Suína	60	Fécula	0,950	300	<0,3 ^d
	B	Suína	60	Fécula	0,950	300	<0,3
	C	Suína	60	Fécula	0,950	300	<0,3
	D	Suína	60	Fécula	0,955	300	<0,3
	E	Suína	60	Fécula	0,955	300	<0,3
	F	Suína	60	Fécula	0,955	300	<0,3
	G	Suína	60	Fécula	0,960	300	<0,3
	H	Suína	60	Fécula	0,960	300	<0,3
	I	Suína	60	Fécula	0,960	300	<0,3
B	A	Frango	47	Ambos	0,953	900	9,3
	B	Frango	47	Ambos	0,953	900	$2,4 \times 10$
	C	Frango	47	Ambos	0,953	900	7,5
	D	Suína	40	Ambos	0,973	720	7,5
	E	Suína	40	Ambos	0,973	720	$1,5 \times 10$
	F	Suína	40	Ambos	0,973	720	4,3
C	A	Suína	60	Fécula	0,960	300	0,74
	B	Suína	60	Fécula	0,960	300	4,3
	C	Suína	60	Fécula	0,960	300	9,3
	D	Suína	60	Fécula	0,960	300	4,3
	E	Suína	60	Fécula	0,960	300	3,8
	F	Frango	45	Ambos	0,960	300	2,3
	G	Frango	45	Ambos	0,958	300	$2,4 \times 10$
	H	Frango	45	Ambos	0,958	300	0,92
	I	Frango	45	Ambos	0,958	300	0,92

^a Número Mais Provável por grama

^b Matéria-prima carne

^c Nitrito adicionado

^d Limite de detecção do método

Tabela 5. Contagens de esporos de mesófilos anaeróbios das massas cruas de mortadela analisadas (Continuação).

Empresa	Amostra	Formulação				Nitrito (ppm) ^c	Esporos de mesófilos anaeróbios (NMP/g) ^a
		MP ^b	CMS (%)	Amido/ Fécula	Aw		
	A	Suína	60	Fécula	0,975	300	1,5
	B	Suína	60	Fécula	0,975	300	1,5
	C	Suína	60	Fécula	0,975	300	9,3
	D	Suína	40	Fécula	0,962	300	<0,3
	E	Suína	40	Fécula	0,962	300	<0,3
	F	Suína	40	Fécula	0,962	300	0,36
	G	Suína	60	Fécula	0,975	300	3,6
	H	Suína	60	Fécula	0,975	300	3,6
	I	Suína	60	Fécula	0,975	300	3,6
	J	Suína	40	Fécula	0,962	300	3,6
	K	Suína	40	Fécula	0,962	300	3,6
	L	Suína	40	Fécula	0,962	300	3,6
	M	Suína	60	Fécula	0,975	400	3,6
	N	Suína	60	Fécula	0,975	400	3,6
	O	Suína	60	Fécula	0,975	400	9,2
	P	Suína	40	Fécula	0,962	300	3,6
D	Q	Suína	40	Fécula	0,962	300	3,6
	R	Suína	40	Fécula	0,962	300	3,6
	S	Suína	40	Fécula	0,962	300	0,36
	T	Suína	40	Fécula	0,962	300	0,92
	U	Suína	40	Fécula	0,962	300	<0,3
	V	Suína	40	Fécula	0,962	300	3,6
	W	Suína	40	Fécula	0,962	300	3,6
	X	Suína	40	Fécula	0,962	300	2,3
	Y	Suína	60	Fécula	0,975	400	0,92
	Z	Suína	60	Fécula	0,975	400	1,0 x 10 ²
	AA	Suína	60	Fécula	0,975	400	2,3
	AB	Suína	40	Fécula	0,962	300	4,3
	AC	Suína	40	Fécula	0,962	300	1,5
	AD	Suína	40	Fécula	0,962	300	7,5
	AE	Suína	40	Fécula	0,962	300	4,3
	AF	Suína	40	Fécula	0,962	300	4,3
	AG	Suína	40	Fécula	0,962	300	0,92

^a Número Mais Provável por grama^b Matéria-prima carne^c Nitrito adicionado^d Limite de detecção do método

Alguns trabalhos já realizados corroboram com os resultados obtidos neste estudo. GREENBERG et. al. (1966) realizaram um estudo para quantificar e isolar esporos de *C. botulinum* em amostras de carnes cruas. A conclusão que tiveram do estudo é que o nível de contaminação de esporos em carne crua é muito baixo, ocorrendo raramente a contaminação do produto. STRINGER et. al. (2011) realizaram um estudo de determinação do potencial de produção de toxina botulínica durante a vida útil de carne bovina resfriada embalada a vácuo. Estes concluíram que a probabilidade de crescimento de *C. botulinum* e formação de toxina neste produto pode ser reduzida, mas é possível que ocorra a 5 °C após 28 dias de armazenamento. GLASS e MARSHALL (2013) verificaram que a prevalência de esporos de *C. botulinum* em carnes e produtos cárneos é inferior a 10 %, sendo que a carga de esporos geralmente se apresenta em números muito baixos e sua distribuição varia por região geográfica. Segundo estes autores, a presença da bactéria *C. botulinum* em concentrações reduzidas apresenta um desafio para a segurança dos produtos cárneos.

5.2.3. Isolamento, caracterização bioquímica e identificação molecular dos isolados de esporos de bactérias mesófilas anaeróbias

Um total de 41 culturas com características típicas de clostrídios sulfito-redutores foi isolada em ágar TSC. Os resultados da caracterização dos microrganismos isolados encontram-se disposto nos Tabela 6.

A interpretação dos resultados levou em consideração as reações típicas para *C. sporogenes*. Desta forma, dentre as culturas, 42 % apresentaram-se negativas para o teste de lecitinase, 20 % apresentaram-se positivas para o teste de lipase, 100 % apresentaram-se negativas para o teste de catalase e 20 % apresentaram-se negativas para o teste de nitrato. Destas, três culturas foram selecionadas como o perfil similar ao *C. sporogenes*, sendo elas: CP5, JP2 e OP2.

Tabela 6. Caracterização bioquímica, fisiológica e morfológica das cepas das bactérias mesófilas.

Código das amostras	Esporos	Sulfito	Lecitinase	Lipase	Gram	Catalase	Nitrato	Motilidade	Lactose	Gelatina
AP1	P	+	+	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
AP2	P	+	+	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
AP3	P	+	+	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
AP4	P	+	+	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
AP5	P	+	+	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
BP1	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	+
BP2	P	+	-	+	Bastonete G+	-	-	+	+	-
BP3	P	+	-	+	Bastonete G+	-	-	+	+	-
BP4	P	+	-	+	Bastonete G+	-	+	+	+	-
BP5	P	+	-	+	Bastonete G+	-	+	+	+	-
CP5	P	+	-	+	Bastonete G+	-	-	+	+	-
DP1	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
DP2	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
DP3	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
DP4	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
DP5	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
DP6	P	+	+	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
DP7	P	+	+	+	Bastonete G+	-	+	+	+	-
DP8	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	+	+	-
EP1	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
EP2	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
EP3	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
EP4	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
EP5	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
EP6	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-

P = Presença; (+) = Resultado positivo para o teste; (-) = Resultado negativo para o teste; G+ = Gram positivo; v = variável

Tabela 6. Caracterização bioquímica, fisiológica e morfológica das cepas das bactérias mesófilas (Continuação).

Código das amostras	Esporos	Sulfito	Lecitinase	Lipase	Gram	Catalase	Nitrato	Motilidade	Lactose	Gelatina
EP7	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
EP8	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
EP9	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
EP10	P	+	-	-	Bastonete G+	-	-	-	+	-
FP1	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
FP2	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
FP3	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
FP4	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
FP5	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
HP1	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
HP2	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
HP3	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
HP4	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
HP5	P	+	-	-	Bastonete G+	-	+	+	+	-
JP2	P	+	-	+	Bastonete G+	-	-	+	+	-
OP2	P	+	-	+	Bastonete G+	-	-	+	+	-
<i>C. sporogenes</i>	P	+	-	+	Bastonete G+	-	-	v	+	+
<i>C. perfringens</i>	P	+	+	-	Bastonete G+	-	v	-	+	+

P = Presença; (+) = Resultado positivo para o teste; (-) = Resultado negativo para o teste; G+ = Gram positivo; v = variável

5.2.4. Identificação molecular de *C. sporogenes*

A presença do gene *colA* indica a presença de colagenase em *C. sporogenes*. As enzimas colagenases são proteases que têm a capacidade de quebrar a estrutura triplice do colágeno natural e desnaturado. Elas desempenham um papel importante em diversos processos fisiológicos e patológicos, como no desenvolvimento dos ossos do feto, desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, artrite reumatoide, invasão de tumores malignos, úlceras intestinais e inflamação crônica das gengivas. Em microrganismos, estas enzimas possuem a função de degradar a barreira de colágeno do hospedeiro durante uma infecção (GUTIERREZ-FERNANDEZ et al., 2007; WU et al., 2010).

A presença do gene *colA*, responsável pela codificação da enzima colagenase após análise de PCR foi evidenciada nas culturas CP5, JP2 e OP2. Os padrões positivos de *C. sporogenes* (PA3679, ATCC3584, ATCC11437, ATCC19404), apresentaram o gene conforme indicado na Figura 4, comprovando a eficiência do primer utilizado no método analítico.

A ausência dos genes target IOA, CBMLB, CBMLE e CBMLF indica que as culturas não possuem genes de toxina botulínica A, B, E e F, portanto, são cultivos seguros para realização dos demais testes e avaliações. A presença do gene IAC (controle interno) comprova a eficiência das reações multiplex utilizadas no método analítico (Figura 4).

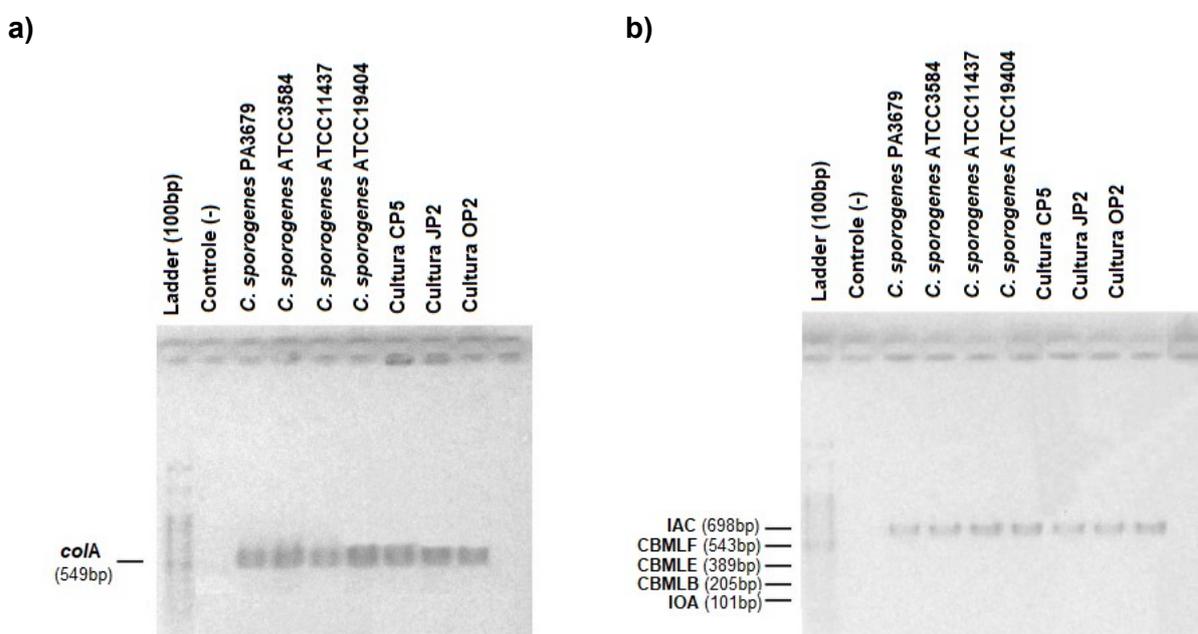


Figura 4. Amplificação de PCR de fragmentos de DNA das culturas CP5, JP2 e OP2 e dos padrões positivos de *Clostridios sporogenes* (PA3679, 3584, ATCC11437, ATCC19404), com o emprego do primer do gene *colA* (a) e dos genes target IOA, CBMLB, CBMLE e CBMLF (b).

5.2.5. Avaliação *in vitro* da susceptibilidade dos esporos de bactérias anaeróbias mesófilas isoladas de mortadelas comerciais frente às principais barreiras usadas em produtos cárneos curados e cozidos

a) Determinação da curva de germinação e crescimento dos esporos

Os resultados da curva de germinação e crescimento das culturas CP5, JP2 e OP2 dos esporos e do *C. sporogenes* são apresentados na Figura 5.

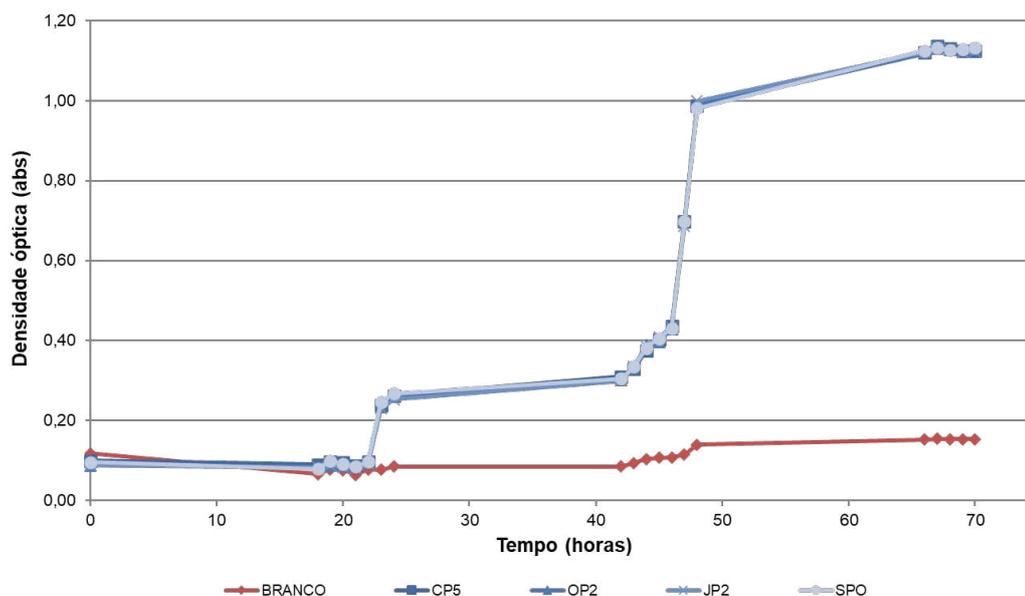


Figura 5. Resultados da curva de crescimento dos esporos dos microrganismos isolados após incubação na temperatura de 30 °C.

É possível observar que as culturas isoladas na temperatura de 30 °C apresentaram o mesmo perfil de crescimento do *C. sporogenes*. Observou-se também que a germinação ocorreu entre 22 h e 25 h de incubação. Este resultado foi validado pela microscopia de contraste de fase, onde foi observado que após 22 h, 50 % das células presentes na lâmina eram vegetativas. Após o período de germinação, foi constatado o modelo de Gompert modificado (BARANY & ROBERTS, 1995) que o início da fase lag foi com $45,645 \pm 0,24$ h de incubação para todas as culturas avaliadas.

b) Verificação da capacidade de germinação e crescimento dos esporos em diferentes temperaturas de estocagem

Os resultados da verificação da capacidade de germinação e crescimento dos esporos dos microrganismos isolados em diferentes temperaturas foram apresentados na Figura 6.

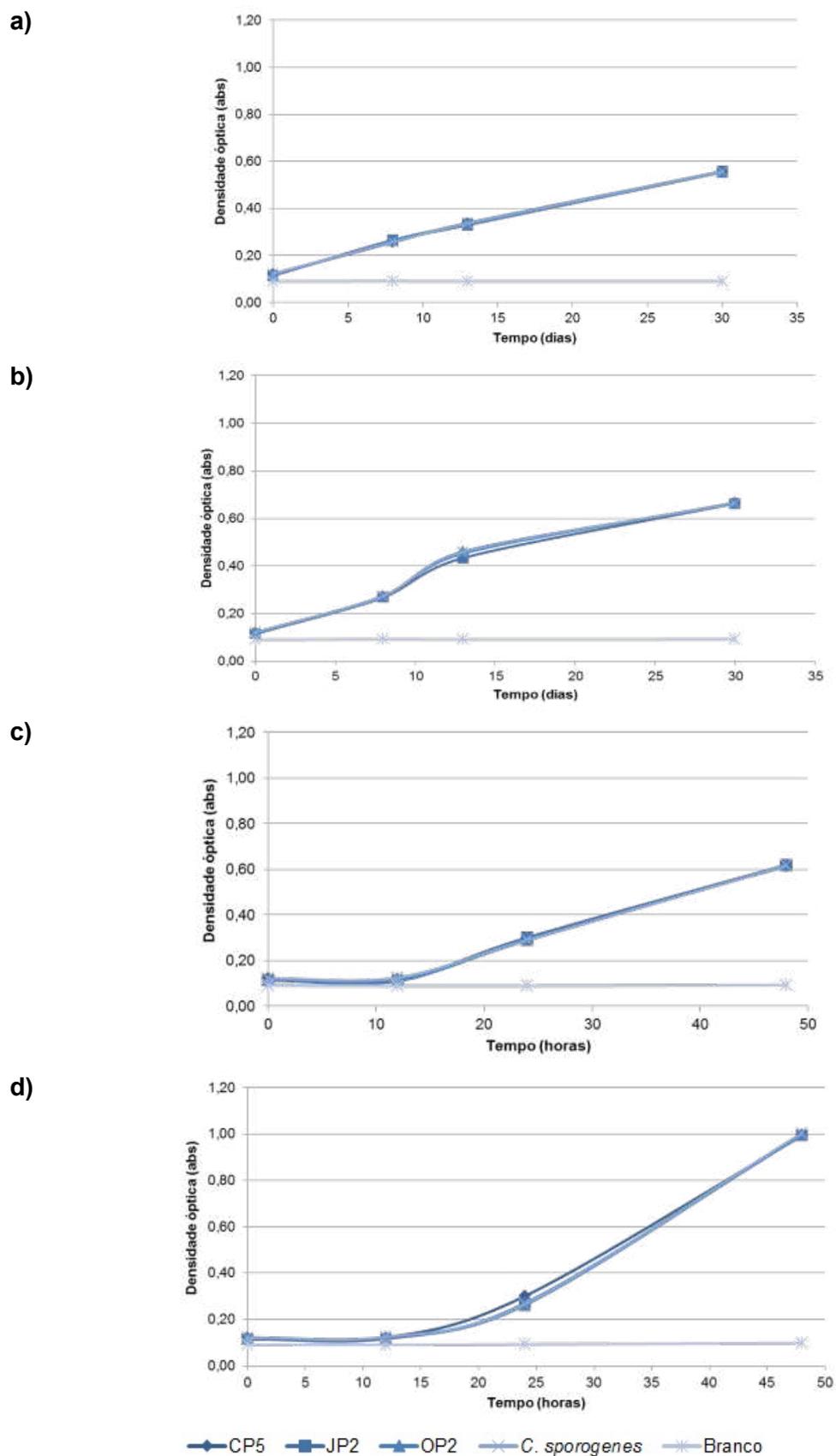


Figura 6. Capacidade de germinação e de crescimento dos esporos em diferentes temperaturas de estocagem: a) 4 °C / 30 d; b) 10 °C / 30 d; c) 25 °C / 48 h e d) 35 °C / 48 h.

Observou-se que a temperatura é realmente um fator fundamental para o retardo da germinação dos esporos e crescimento das vegetativas. Comparando a germinação das culturas, observou-se que em um período de 20 dias o valor de absorvância atingido foi próximo a 0,400 a 4 °C e a 10 °C apresentou valor próximo a 0,600. Nas temperaturas de 25 °C e 35°C observou-se crescimento rápido, sendo a transição da fase lag a log no período entre 12 h e 23 h e entre 12 h e 24 h, respectivamente. Portanto, presume-se que a temperatura ótima para crescimento ocorra entre 25 °C e 35 °C. DODDS & AUSTIN (2001) mostraram que a temperatura mínima de crescimento para as cepas de *C. botulinum* B, E e F é em torno de 3,3 °C, sendo que a temperatura ótima de crescimento é entre 18 °C e 25 °C e a máxima é de 45 °C.

c) Avaliação *in vitro* do efeito inibitório de agentes químicos, físicos e biológicos na germinação dos esporos

É possível observar na Figura 7a a inibição de aproximadamente 90,9% da germinação das culturas em valores de atividade de água de 0,930 e 0,940 e redução de aproximadamente 68,2 % na atividade de água de 0,950 e 0,955, nos demais valores não houve inibição. Em 2002, GELLI et al. apresentaram um estudo no qual a atividade de água inferior a 0,93 era fator limitante para o crescimento do *C. botulinum*, dizendo ainda que a bactéria não possui habilidade competidora frente a outros microrganismos. CERESER et al. (2008) também relata que o pH inferior a 4,5 cessa sua multiplicação. Estas informações se assemelham com os resultados apresentados na Figura 7b, onde houve inibição de aproximadamente 90,9 % da multiplicação das culturas testadas em pH com valores de 3,0 a 4,6. O pH 5 apresentou inibição de aproximadamente 24,54 %.

Observou-se na Figura 7c que houve inibição de aproximadamente 90,9 % da germinação das culturas a partir da concentração de 50 ppm de nitrito. AMSTALDEN et al. (1997) observaram a formação de toxina botulínica em presunto e mortadela inoculados com aproximadamente 10^4 esporos de *C. botulinum* tipos A e B, considerando uma temperatura de estocagem de 30 °C. Nas amostras de mortadela preparadas com 200 ppm de nitrito de sódio e 500 ppm de eritorbato de sódio, após 28 dias de armazenamento a 30 °C não foi detectada toxina botulínica e o nitrito sofreu redução para 1,6 ppm. Já o presunto armazenado na mesma temperatura apresentou toxina botulínica após 12 dias com residual de nitrito equivalente a zero. Reforçando o efeito inibitório do nitrito, PIVNICK et al. (1969) concluíram que para suprir a ausência de nitrito em carne suína curada há a necessidade da adição de concentrações superiores a 6,1 % de cloreto de sódio para evitar a produção de toxina botulínica. Estes testes foram realizados com adição de 10^6 esporos de *C. botulinum* por grama de carne.

Observou-se na Figura 7d que houve efeito inibitório do lactato de sódio de aproximadamente 71,82 % nas concentrações de 2,5 % e 3,0 % devido à alteração em relação à densidade ótica. Segundo MILLER et al. (1993) uma concentração de 2,0 % de lactato de sódio é capaz de impedir a produção de toxina, como também inibir o crescimento do *C. botulinum* em carne de peru. MEYER et al. (2003) relataram que adicionando 2,5 % de lactato de sódio em peito de peru cozido armazenado em temperatura ambiente, foi possível um retardo de 14 dias para que ocorresse a germinação de esporos de *C. sporogenes*.

A Figura 7e apresenta a ineficiência de inibição do eritorbato de sódio, no qual em nenhuma das concentrações avaliadas tiveram eficiência inibitória. Porém, avaliando a Figura 6f observou-se fator inibidor moderado, média de 38 %, do nitrito com eritorbato a partir de 50 ppm de nitrito adicionado. Em contrapartida, nas concentrações superiores a 200 ppm a inibição foi mais eficiente, aproximadamente 90,9 %. JAY et al. (2005) relataram o efeito competidor do eritorbato, o qual acelera a redução do nitrito quando adicionados em carnes curadas formando o óxido nítrico que combinará com a mioglobina para realizar outras reações químicas.

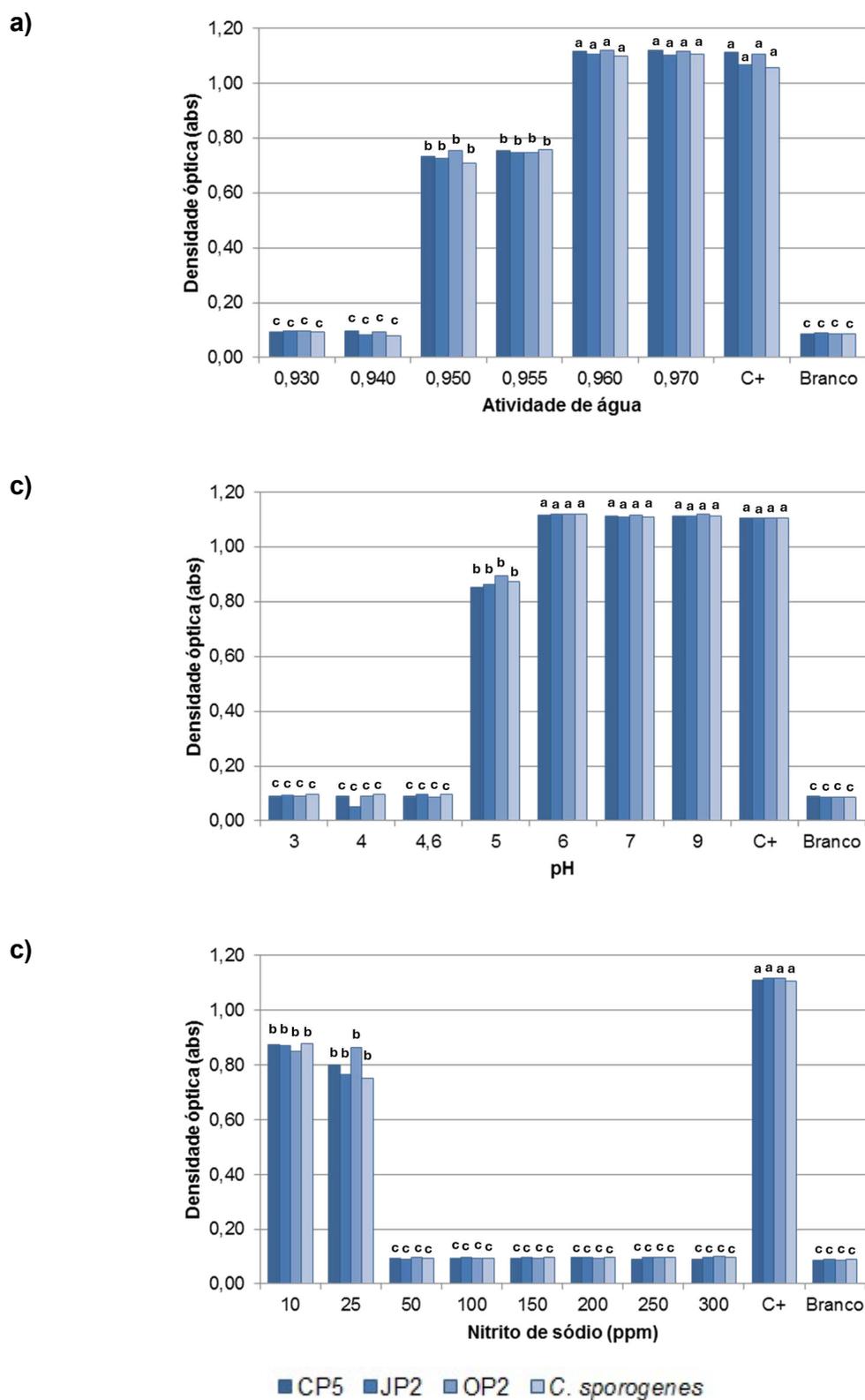
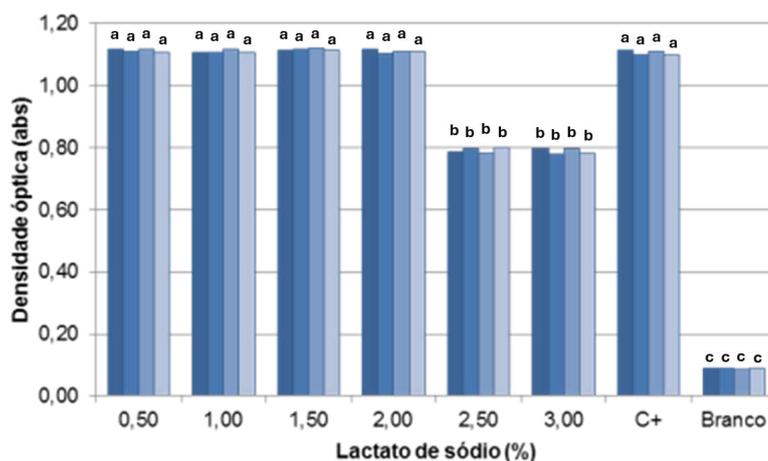
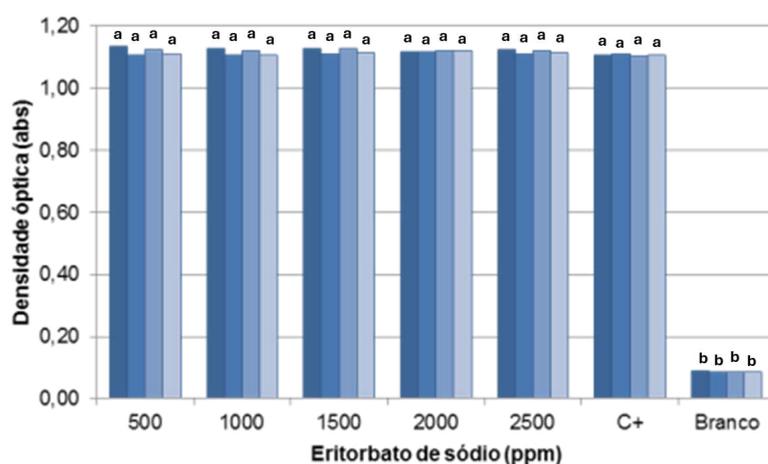


Figura 7. Efeito de inibição dos agentes químicos e físicos frente aos esporos dos microrganismos isolados e do *C. sporogenes*. a) atividade de água; b) pH; c) nitrito; d) lactato de sódio; e) eritorbato de sódio e f) nitrito (150 ppm) combinado com eritorbato de sódio. ^{a-d} Médias na mesma figura diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo método de Tukey.

d)



e)



f)

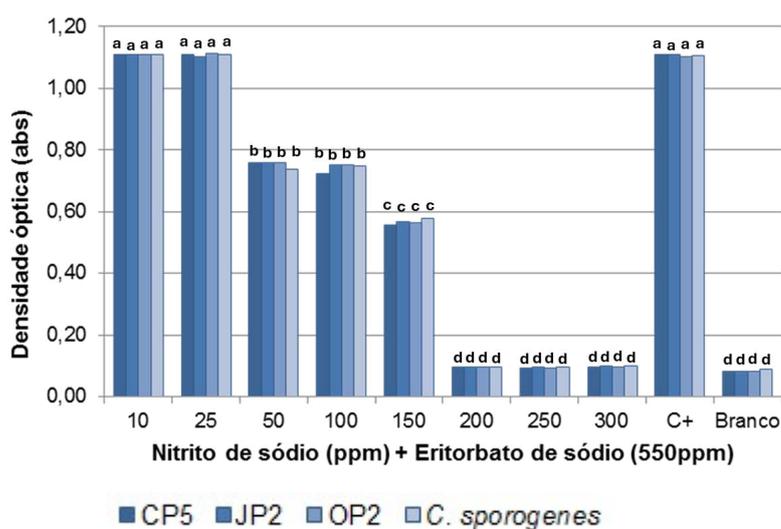


Figura 7 (continuação). Efeito de inibição dos agentes químicos e físicos frente aos esporos dos microrganismos isolados e do *C. sporogenes*. a) atividade de água; b) pH; c) nitrito; d) lactato de sódio; e) eritorbato de sódio e f) nitrito (150 ppm) combinado com eritorbato de sódio. ^{a-d} Médias na mesma figura diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo método de Tukey.

d) Avaliação *in vitro* da eficácia do nitrito obtido a partir de extrato vegetal durante o tratamento térmico

Os esporos dos microrganismos isolados e dos padrões de *C. sporogenes* apresentaram resistência ao tratamento térmico de 74 °C / 15 s sendo que as contagens iniciais e finais permaneceram em aproximadamente 6,0 log UFC/g. Em contrapartida, as células vegetativas dos microrganismos isolados e dos padrões de *C. sporogenes* apresentaram sensibilidade ao tratamento térmico com a redução de 6 ciclos log UFC/g ao final do processo.

Na Figura 8, observou-se a ocorrência de crescimento dos microrganismos após o período de incubação. Este resultado indica a sensibilidade do nitrito de sódio durante sua exposição a altas temperaturas e como é importante mantermos um conjunto de medidas de controle ao crescimento de clostrídios durante a vida útil.

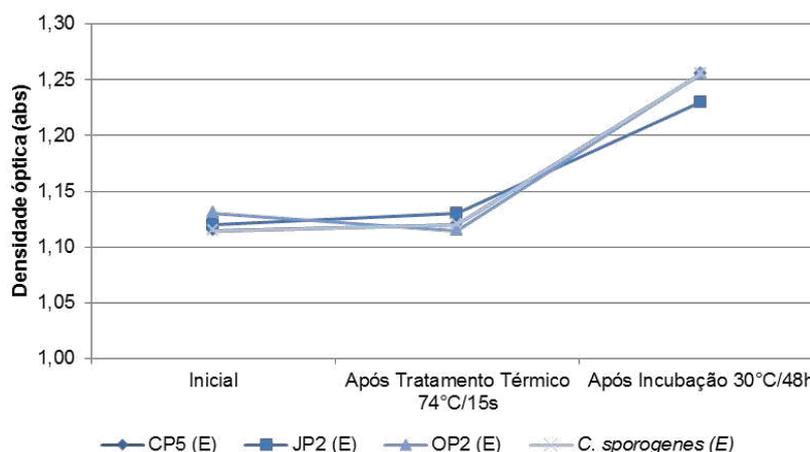


Figura 8. Avaliação da resistência das culturas submetidas ao tratamento térmico de 74 °C por 15 s combinado com a adição de 150 ppm de nitrito *in vitro*.

5.3. Etapa II: Avaliação da segurança microbiológica da substituição do nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido em mortadela estável em temperatura ambiente

5.3.1 Avaliação antimicrobiana *in vitro* da eficácia da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido

As linhagens de *C. sporogenes* mostraram-se sensíveis aos tratamentos aplicados com os ácidos acético, cítrico, láctico, málico e tartárico nas concentrações testadas (Tabela 7). Esses compostos ocasionaram uma redução significativa no pH, com valores que variavam entre 2,20 e 3,85, indicando uma possível ação antimicrobiana destes compostos por meio da redução do pH intracelular. O composto à base de ácido propiônico apresentou desempenho similar aos demais ácidos nas concentrações testadas, porém não

ocasionou uma redução tão acentuada dos valores de pH, os quais variaram entre 5,46 e 5,63. A atividade de água das soluções dos ácidos avaliados oscilou entre 0,955 e 0,986, valores encontrados em diversos produtos cárneos cozidos.

A aplicação de ácidos orgânicos tamponados em produtos cárneos com o objetivo de garantir a segurança microbiológica destes alimentos vem sendo estudadas por cientistas de todo o mundo. Em um trabalho realizado por SABAH et al. (2003) foi verificada a redução de 1 log UF/g durante o período de resfriamento de 18 h, após aplicação de 2,0 % e 4,8 % de citrato de sódio, 2,0 % e 4,8 % de lactato de sódio (solução com 60 %) e 0,25 % de diacetato de sódio em *Roasted beef* reestruturado. Todos os tratamentos foram tamponados a um pH de 5,6, 5,0 e 4,4. Neste mesmo estudo também foi evidenciado que o uso de citrato de sódio ou lactato de sódio em uma concentração a partir de 2 % inibiram o crescimento de *C. perfringens* ao longo do período de resfriamento de 18 h.

As linhagens de *C. sporogenes* apresentaram resistência nas concentrações de 2 % e 5 % de lactato de sódio e sensibilidade na concentração de 10 % deste composto (Tabela 7). A aplicação de lactato de sódio não apresentou variações nos valores de pH, sendo que foram encontrados valores de 6,93. Entretanto, os valores de atividade de água oscilaram entre 0,975 com aplicação de 2 % e 0,945 com aplicação de 10 %. Esta redução nos valores de atividade de água pode ter contribuído na inibição da germinação dos esporos de *C. sporogenes* na concentração de 10 %. A aplicação de concentrações superiores a 3 % de lactato de sódio não é recomendada devido ao sabor metálico residual no produto.

A aplicação de sorbato de potássio nas concentrações de 2,5 % e 5,0 % não foram capazes de inibir a germinação dos esporos de *C. sporogenes*. Segundo PAREDES-SABJA et al. (2008), o sorbato de potássio pode estimular a germinação dos esporos de *C. sporogenes*, já que o íon potássio um forte indutor para germinação de clostrídios. Portanto, devem ser realizados outros estudos de aplicação em produtos cárneos para avaliar o uso destes compostos em produtos cárneos.

As linhagens de *C. sporogenes* apresentaram resistência na concentração de 25ppm de nitrito de sódio e sensibilidade nas concentrações de 50 ppm e 150 ppm (Tabela 7). Resultados similares foram observados no tratamento com aplicação do nitrito de sódio em conjunto com 500 ppm de eritorbato de sódio. Entretanto, no tratamento somente com a adição de 500ppm de eritorbato de sódio ambas as culturas apresentaram resistência. É importante ressaltar que o nitrito é degradado durante o armazenamento, e sua aplicação em produtos cozidos tem a finalidade de realizar o processo de cura e de combater a germinação dos esporos durante as etapas de processamento e cozimento dos produtos.

Após a substituição do nitrito de sódio sintético por nitrito de sódio obtido a partir de extratos vegetais de aipo e acelga, foi possível observar o mesmo perfil de germinação dos esporos de *C. sporogenes* (Tabela 7). Desta forma, a substituição *in vitro* destes compostos apresentou potencial de inibição similar aos encontrados com o nitrito de sódio sintético. Um trabalho realizado por KING et al. (2015) também demonstrou que concentrações equivalentes de nitrito, independentemente da fonte, fornecem inibição semelhante de *C. perfringens* durante o resfriamento. A aplicação de ascorbato potencializa o efeito antimicrobiano do nitrito sobre o *C. perfringens* em concentrações comumente usadas em carnes sem adição de nitrito sintético.

As linhagens de *C. sporogenes* apresentaram sensibilidade aos *blends* adicionados de 2% de lactato de sódio, 500 ppm de eritorbato de sódio e 150 ppm de nitrito de sódio ou extratos vegetais de aipo ou acelga. Entretanto, estas mesmas linhagens apresentaram resistência aos *blends* quando foi adicionado 50 ppm de nitrito de sódio ou dos extratos vegetais (Tabela 8). Os *blends* avaliados apresentaram valores de pH entre 6,72 e 6,75 e atividade de água entre 0,967 e 0,968. Estes resultados indicam que o nitrito de sódio desempenha um importante papel no controle da germinação de *C. sporogenes* quando os valores de atividade de água encontram-se acima de 0,96. Como medida para redução nos níveis de nitrito de sódio, podemos considerar a redução da atividade de água ou aplicação outros métodos de conservação combinados.

Golden et al. (2017) realizou um estudo onde avaliou a influência da composição do produto e da temperatura de armazenamento na produção de toxina por *C. botulinum*. Para tanto, refeições experimentais à base de carnes, vegetais ou carboidratos foram divididas em dois grupos, sendo um grupo com valores de $\text{pH} \leq 5,8$ e o outro com valores de $\text{pH} > 5,8$. Todas as amostras foram inoculadas com *C. botulinum* e armazenadas a 25 °C e 12,5 °C por 48 h e 72 h. Todas as amostras armazenadas a 25 °C apresentaram a produção de toxina botulínica após 72 h, enquanto as amostras armazenadas a 12,5 °C foram dependentes do valor de pH, apresentando produção de toxina botulínica nas amostras com $\text{pH} > 5,8$.

Estes resultados demonstram que as barreiras de conservação aplicadas em produtos cárneos podem ou não apresentar sinergismo entre si, sendo necessária a aplicação de ferramentas de avaliação destas barreiras em condições em que o controle do patógeno dentro da indústria não seja eficaz. Desta forma, podemos concluir que os estudos gerados pela academia em parceria com as indústrias têm impacto direto na manutenção da segurança dos alimentos. E estes dados, podem fornecer informações mais confiáveis aos órgãos reguladores para gerar normas e regulamentos mais robustos do ponto de vista da segurança microbiológica dos alimentos e mais aplicáveis do ponto de vista das indústrias.

Tabela 7. Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos sobre a germinação de *C. sporogenes*.

Composto	Concentração (%)	Valor de pH	Atividade de água	<i>C. sporogenes</i>						
				ATCC 19404	ATCC 11437	ATCC 3584	PA 3679	CP5	JP2	OP2
Ácido acético	2,0	3,45	0,979	S	S	S	S	S	S	S
	3,0	3,67	0,978	S	S	S	S	S	S	S
	5,0	3,80	0,977	S	S	S	S	S	S	S
Ácido cítrico	2,0	3,22	0,984	S	S	S	S	S	S	S
	3,0	2,74	0,986	S	S	S	S	S	S	S
	5,0	2,66	0,980	S	S	S	S	S	S	S
Ácido láctico	2,0	2,88	0,972	S	S	S	S	S	S	S
	3,0	2,94	0,978	S	S	S	S	S	S	S
	5,0	2,65	0,955	S	S	S	S	S	S	S
Ácido málico	2,0	2,20	0,982	S	S	S	S	S	S	S
	3,0	3,01	0,980	S	S	S	S	S	S	S
	5,0	2,79	0,980	S	S	S	S	S	S	S
Ácido tartárico	2,0	3,12	0,985	S	S	S	S	S	S	S
	3,0	3,66	0,983	S	S	S	S	S	S	S
	5,0	3,85	0,984	S	S	S	S	S	S	S
Ácido propiônico (composto)	0,3	5,63	0,981	S	S	S	S	S	S	S
	0,4	5,54	0,982	S	S	S	S	S	S	S
	0,5	5,46	0,984	S	S	S	S	S	S	S

R = Resistente; S = Sensível.

Tabela 7. Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos sobre a germinação de *C. sporogenes*. (Continuação)

Composto	Concentração	Valor de pH	Atividade de água	<i>C. sporogenes</i>						
				ATCC 19404	ATCC 11437	ATCC 3584	PA 3679	CP5	JP2	OP2
Lactato de sódio	2,0 %	6,94	0,975	R	R	R	R	R	R	R
	5,0 %	6,93	0,966	R	R	R	R	R	R	R
	10,0 %	6,95	0,945	S	S	S	S	S	S	S
Sorbato de potássio	2,5 %	6,89	0,980	R	R	R	R	R	R	R
	5,0 %	7,15	0,973	R	R	R	R	R	R	R
Nitrito de sódio	25 ppm	6,77	0,984	R	R	R	R	R	R	R
	50 ppm	6,75	0,985	S	S	S	S	S	S	S
	150 ppm	6,74	0,987	S	S	S	S	S	S	S
Eritorbato de sódio	500 ppm	6,75	0,987	R	R	R	R	R	R	R
Nitrito de sódio e Eritorbato de sódio*	25 ppm	6,74	0,986	R	R	R	R	R	R	R
	50 ppm	6,73	0,986	S	S	S	S	S	S	S
	150 ppm	6,73	0,986	S	S	S	S	S	S	S
Extrato de Aipo (pé-convertido)	25 ppm	6,75	0,982	R	R	R	R	R	R	R
	50 ppm	6,74	0,985	S	S	S	S	S	S	S
	150 ppm	6,75	0,983	S	S	S	S	S	S	S
Extrato de Acelga (pé-convertido)	25 ppm	6,74	0,986	R	R	R	R	R	R	R
	50 ppm	6,73	0,985	S	S	S	S	S	S	S
	150 ppm	6,74	0,985	S	S	S	S	S	S	S

* 500ppm; R = Resistente; S = Sensível.

Tabela 8. Avaliação da atividade antimicrobiana de *blends* de compostos antimicrobianos sobre a germinação de *C. sporogenes*.

<i>Blend</i>	Composto	Concen tração	Valor de pH	Atividade de água	<i>C. sporogenes</i>						
					ATCC 19404	ATCC 11437	ATCC 3584	PA 3679	CP5	JP2	OP2
A	Lactato de sódio	2 %	6,72	0,967	S	S	S	S	S	S	S
	Nitrito de sódio	150 ppm									
	Eritorbato de sódio	500 ppm									
B	Lactato de sódio	2 %	6,75	0,968	S	S	S	S	S	S	S
	Extrato de Aipo	150 ppm									
	Eritorbato de sódio	500 ppm									
C	Lactato de sódio	2 %	6,74	0,968	S	S	S	S	S	S	S
	Extrato de Acelga	150 ppm									
	Eritorbato de sódio	500 ppm									
D	Lactato de sódio	2 %	6,72	0,968	R	R	R	R	R	R	R
	Nitrito de sódio	50 ppm									
	Eritorbato de sódio	500 ppm									
E	Lactato de sódio	2 %	6,75	0,967	R	R	R	R	R	R	R
	Extrato de Aipo	50 ppm									
	Eritorbato de sódio	500 ppm									
F	Lactato de sódio	2 %	6,74	0,967	R	R	R	R	R	R	R
	Extrato de Acelga	50 ppm									
	Eritorbato de sódio	500 ppm									

R = Resistente; S = Sensível

5.3.2. Impactos físico-químicos, sensoriais e microbiológico da substituição de nitrito sintético por nitrito obtido a partir de extrato vegetal pré-convertido e de eritorbato de sódio por extrato de acerola em mortadela estável em temperatura ambiente

a) Caracterização da matéria-prima

As amostras de matérias-primas usadas no processamento do lote experimental apresentaram teores de umidade entre 58 % e 70 %, proteína de 13 % a 20%, gordura entre 2,80% e 26% e cinzas entre 1,12 % e 2,20 % (Tabela 9). Estes valores são considerados normais para matérias-primas usadas na elaboração de produtos cárneos (BRASIL, 2000).

Tabela 9. Caracterização físico-química das matérias-primas

Amostras	Resultado (g/100g)*			
	Umidade	Proteína	Gordura	Cinzas
CMS	70,09 ± 0,17	15,15 ± 0,34	15,24 ± 0,12	2,10 ± 0,12
Gel de pele	63,13 ± 0,46	13,96 ± 0,34	25,39 ± 0,32	1,12 ± 0,10
Fígado	74,24 ± 0,31	20,05 ± 0,20	4,05 ± 0,31	1,89 ± 0,08
Carne suína	58,54 ± 0,18	17,42 ± 0,46	26,25 ± 0,23	2,15 ± 0,14
Rim	81,52 ± 0,07	14,84 ± 0,27	2,80 ± 0,07	2,20 ± 0,11

* Resultado médio de triplicata de amostras

Ao avaliar a Tabela 10, nota-se a presença de clostrídios sulfito redutores, seja na forma vegetativa ou esporulada, nas amostras de CMS, gel de pele, fígado e carne suína. Este resultado indica que a qualidade da matéria-prima pode influenciar na prevalência de esporos de clostrídios nas massas de mortadela. Cabe ressaltar que o tratamento térmico aplicado durante o cozimento da mortadela (75 °C) não é suficiente para inativar os esporos de clostrídios. Desta forma, a aplicação de barreiras de inibição da germinação destes esporos durante a vida útil do produto é fundamental para a manutenção da segurança desta categoria de produtos.

Tabela 10. Caracterização microbiológica das matérias-primas

Amostras	Contagem (log UFC/g)*			
	Estafilococos coagulase positiva	<i>Clostridium perfringens</i>	Clostrídios sulfito redutores	Esporos de clostrídios sulfito redutores
CMS	<2,0	<1,0	2,2	2,6
Gel de pele	<2,0	<1,0	1,0	1,3
Fígado	<2,0	<1,0	1,0	1,3
Carne suína	<2,0	<1,0	1,2	1,5
Rim	<2,0	<1,0	<1,0	<1,0

UFC: Unidades Formadoras de Colônias; * Resultado médio de triplicata de amostras

b) Caracterização físico-química da mortadela

Ao avaliar a Tabela 11 podemos verificar que as amostras de mortadela apresentaram valores médios de 14 % de proteína, 14 % de gordura, 5,8 % de carboidratos. Em relação a umidade, as amostras dos tratamentos CT94 e CN94 apresentaram valores médios de 57,8 %, enquanto que as amostras dos tratamentos CT97 e CN97 apresentaram valores de 59,5 %. Desta mesma forma, resultados de cinzas oscilaram aproximadamente 2 % entre as amostras dos tratamentos CT94 e CN94 frente aos tratamentos CT97 e CN97. Estes resultados encontram-se de acordo o regulamento técnico de identidade e qualidade de mortadela (BRASIL, 2000).

As diferenças encontradas nas determinações de umidade e cinzas (Tabela 11) entre os tratamentos é um reflexo dos teores de sal adicionados aos tratamentos para obtenção dos valores de atividade de água entre 0,94 e 0,97. Sendo assim, estas diferenças são esperadas nos tratamentos avaliados.

Tabela 11. Caracterização físico-química em amostras de mortadela após 24 h do processamento.

Tratamentos	Resultado (g / 100 g)*				
	Umidade	Proteína	Gordura	Carboidratos	Cinzas
CT94	57,87 ± 0,03 ^b	14,60 ± 0,01 ^a	14,72 ± 0,01 ^a	5,73 ± 0,00 ^a	6,25 ± 0,00 ^a
CT95	58,40 ± 0,08 ^{ab}	14,61 ± 0,05 ^a	14,75 ± 0,01 ^a	5,83 ± 0,01 ^a	5,37 ± 0,00 ^b
CT97	59,54 ± 0,03 ^a	14,69 ± 0,04 ^a	14,79 ± 0,08 ^a	5,77 ± 0,01 ^a	3,55 ± 0,02 ^c
CN94	57,88 ± 0,07 ^b	14,61 ± 0,02 ^a	14,71 ± 0,05 ^a	5,81 ± 0,01 ^a	6,24 ± 0,00 ^a
CN95	58,41 ± 0,07 ^{ab}	14,61 ± 0,01 ^a	14,77 ± 0,03 ^a	5,85 ± 0,02 ^a	5,35 ± 0,02 ^b
CN97	59,56 ± 0,03 ^a	14,68 ± 0,03 ^a	14,80 ± 0,04 ^a	5,79 ± 0,01 ^a	3,56 ± 0,01 ^c

*Resultados médios de triplicata de amostras; ^{a-c} Médias na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo método de Tukey.

Ao observar a Tabela 12 podemos verificar que os valores de atividade de água alvo durante o planejamento experimental foram alcançados. Os tratamentos que tinham como alvo a atividade de água 0,940 obtiveram valores médios de 0,942, enquanto que as amostras com valor alvo de 0,970 tiveram valores médios de 0,972. Este parâmetro é importante para avaliar o comportamento do extrato vegetal quando são usadas diferentes concentrações de cloreto de sódio e seu impacto na cor vermelha, na dureza e na mastigabilidade.

Em relação aos valores de pH (Tabela 12), os quatro tratamentos apresentaram valores entre 6,30 e 6,37, valores estes considerados normais para mortadela com alto teor de CMS (FEINER, 2006). Este resultado indica que o extrato vegetal não promove alterações nos valores de pH da mortadela.

Tabela 12. Valores de atividade de água e pH em amostras de mortadela após 24 h do processamento.

Tratamentos	Atividade de água*	pH*
CT94	0,942 ± 0,002 ^c	6,30 ± 0,00 ^a
CT95	0,951 ± 0,001 ^b	6,31 ± 0,00 ^a
CT97	0,972 ± 0,001 ^a	6,33 ± 0,01 ^a
CN94	0,943 ± 0,000 ^c	6,30 ± 0,01 ^a
CN95	0,953 ± 0,001 ^b	6,37 ± 0,02 ^a
CN97	0,972 ± 0,001 ^a	6,36 ± 0,02 ^a

*Resultados médios de triplicata de amostras; ^{a-c} Médias na mesma coluna diferem significativamente entre si (p>0,05) pelo método de Tukey.

Na Tabela 13 é possível observar que os valores médios de L* diferiram significativamente (p>0,05) entre si segundo o teste de Tukey, sendo que a mortadela com a cura tradicional apresentou uma cor geral mais escura. Em relação aos valores médios de a*, as amostras não apresentaram diferença significativa (p<0,05) segundo o teste de Tukey, sendo consideradas similares. Os valores de b* apresentaram diferença significativa (p>0,05) segundo o teste de Tukey, sendo que a mortadela com a cura natural foi considerada mais amarela.

O valor de a* é o parâmetro mais importante para avaliar a coloração da carne e dos produtos cárneos. A redução deste valor pode indicar uma descoloração do produto tornando-o inaceitável para o consumidor (HOWE; GULLETT & USBORNE, 1982). Alguns autores têm reportado uma redução desse parâmetro com o uso de antioxidantes naturais ao longo da vida útil (DJERI & WILLIAMS, 2013).

Tabela 13. Valores de cor objetiva L* a* b* em amostras de mortadela após 24 h do processamento.

Tratamento	Cor objetiva		
	L*	a*	b*
CT94	56,73 ^a	9,87 ^a	17,44 ^b
CT95	56,74 ^a	9,89 ^a	17,46 ^b
CT97	56,78 ^a	9,95 ^a	17,46 ^b
CN94	55,79 ^b	10,14 ^a	18,19 ^a
CN95	55,80 ^b	10,16 ^a	18,18 ^a
CN97	55,82 ^b	10,10 ^a	18,22 ^a

^{a-b} Médias na mesma coluna diferem significativamente entre si (p>0,05) pelo método de Tukey.

Ao avaliar o perfil de textura (Tabela 14) podemos verificar que a dureza apresentou valores entre 1,57 e 1,82 para o tratamento com cura tradicional e valores entre 1,24 e 1,85 para o tratamento com cura natural. A dureza está diretamente relacionada com o teor de proteínas e suas interações para a formação do gel. O aumento na força do gel, provocado pela adição de cloreto de sódio, pode ter impactado no resultado da dureza e da mastigabilidade.

A presença de sal interfere diretamente na estrutura das proteínas, aumentando sua capacidade de ligar água e gordura, o que resulta em uma emulsão mais homogênea e uma melhor retenção de umidade (TORNBERG, 2005). O uso do sal em baixas concentrações (*salting in*) é fundamental no processo de emulsificação, pois contribui para a solubilização das proteínas miofibrilares, principalmente actina e miosina, tornando-as mais solúveis em soluções aquosas. Em contrapartida, o uso do sal em altas concentrações (*salting out*) desnatura as proteínas ao alterar o ambiente ao redor das moléculas proteicas, o que afeta suas estruturas e interações. Quando há uma alta concentração de sal, a água disponível para solubilizar as proteínas é reduzida. Essa diminuição na disponibilidade de água força as proteínas a se agregarem e se precipitarem, levando à desnaturação. Essa precipitação e desnaturação das proteínas, paradoxalmente, pode tornar o produto mais mole em alguns casos. Isso ocorre porque, à medida que as proteínas se precipitam e perdem sua estrutura original, elas formam uma matriz menos coesa e mais permeável (FEINER, 2016). Como resultado, a retenção de água pode diminuir e o produto pode perder firmeza, levando a uma textura mais mole, conforme observado nos tratamentos CT94 e CN94 (Tabela 14).

Tabela 14. Valores de perfil de textura em amostras de mortadela após 24 h do processamento.

Tratamento	Perfil de textura*				
	D (kg)	E	C	G	M
CT94	1,24 ± 0,32 ^c	0,85 ± 0,02 ^a	0,42 ± 0,14 ^a	1,21 ± 0,59 ^a	1,04 ± 0,46 ^a
CT95	1,57 ± 0,43 ^b	0,85 ± 0,03 ^a	0,46 ± 0,13 ^a	1,23 ± 0,60 ^a	1,05 ± 0,53 ^a
CT97	1,82 ± 0,53 ^a	0,86 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,08 ^a	1,20 ± 0,19 ^a	1,03 ± 0,16 ^a
CN94	1,24 ± 0,22 ^c	0,86 ± 0,03 ^a	0,51 ± 0,06 ^a	1,21 ± 0,23 ^a	1,04 ± 0,25 ^a
CN95	1,55 ± 0,28 ^b	0,88 ± 0,03 ^a	0,51 ± 0,12 ^a	1,22 ± 0,36 ^a	1,08 ± 0,31 ^a
CN97	1,82 ± 0,24 ^a	0,87 ± 0,01 ^a	0,54 ± 0,02 ^a	1,22 ± 0,13 ^a	1,07 ± 0,12 ^a

* Resultados médios de triplicata de amostras; ^{a-b} Médias na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) pelo método de Tukey; D: Dureza (kg); E: Elasticidade; C: Coesividade; G: Gomosidade; M: Mastigabilidade.

c) Vida útil

Os resultados das análises físico-químicas realizadas durante a vida útil das amostras de mortadela encontram-se descritas nas Figuras 9 e 10.

As amostras de mortadela analisadas apresentaram um baixo Índice de Peróxido (IP) durante a vida útil. Ao observar a Figura 10, podemos verificar que tanto as amostras elaboradas com a cura e o acelerador de cura tradicional e as amostras elaboradas com o extrato vegetal apresentaram valores de IP máximos de aproximadamente 19 mEQ de O_2 / kg de gordura.

O Índice de Peróxido é um indicador do estágio inicial da oxidação lipídica, quando sua presença é detectada pode-se indicar a deterioração de características sensoriais como odor e sabor. O processo de oxidação ocorre a partir da interação de um iniciador com o oxigênio, e uma vez ativo, reage com o ácido graxo insaturado, retirando um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente à ligação dupla cis do ácido graxo insaturado e, assim, forma radicais alílicos. Esta reação, segue em cadeia e é finalizada somente quando as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio são esgotadas (KANNER, 1994). O processo de autooxidação de gorduras na ausência de oxigênio, também conhecida como rancificação aneróbica, ocorre principalmente através da ação de enzimas lipases e lipoxigenases, que quebram os triglicerídeos em ácidos graxos livres e monoglicerídeos. Esse processo pode levar à formação de compostos, como aldeídos e cetonas, que afetam negativamente o odor, sabor e a qualidade dos produtos cárneos.

Na literatura poucos são os trabalhos que relacionam o Índice de Peróxido de mortadelas estáveis em temperatura ambiente durante a vida útil. Talvez, por se tratar de um produto que é embalado em uma tripa impermeável ao oxigênio, o próprio envoltório atue na proteção da mortadela ao contato com o oxigênio e previna um processo oxidativo.

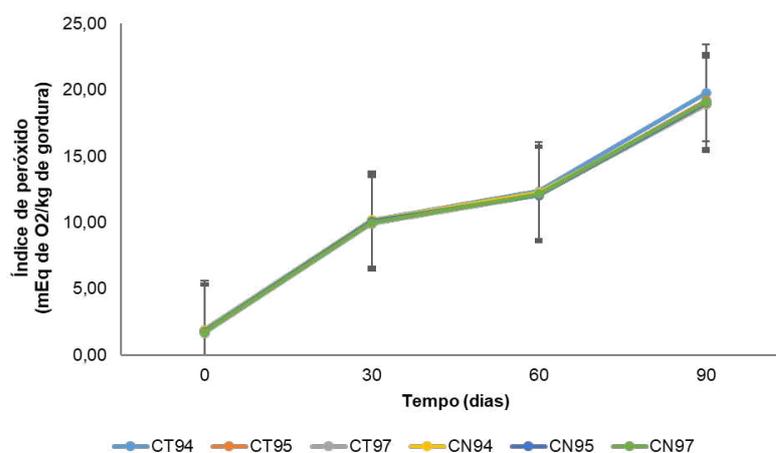


Figura 9. Valores médios de índice de peróxidos em mortadelas elaboradas com cura tradicional e cura natural durante o armazenamento a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 dias.

As amostras de mortadela elaboradas com a cura tradicional apresentaram valores médios de residual de nitrato de sódio de aproximadamente 2 mg / kg. Este resultado está de acordo considerando o tipo de sal de cura que foi usado para o processamento, sendo que este ingrediente tinha em sua composição cloreto de sódio (90 %) e nitrito de sódio (10 %) e com o fato de que em produtos cárneos curados, uma boa quantidade de nitrito adicionado é oxidado a nitrato por enzimas oxidases. Portanto, residuais de nitrato de sódio em torno de 2 a 5 mg / kg são normalmente encontrados em produtos adicionados somente de nitrito de sódio (FEINER, 2016)

Em relação aos resultados de nitrato de sódio residual nas amostras de mortadela elaboradas com nitrito obtido a partir de um extrato vegetal, destaca-se que os níveis residuais médios encontram-se entre 55 e 56 mg / kg durante todo o período de vida útil do produto. Este fator pode estar relacionado com a ausência do crescimento de bactérias que possuem a capacidade de conversão do nitrato de sódio a nitrito de sódio, as chamadas bactérias nitrificantes. Dentre as bactérias nitrificantes podemos destacar as bactérias láticas, as quais também são consideradas de importância dentro do perfil de deterioração de produtos curados. Como as mortadelas passaram por uma etapa de cozimento (75 °C) e estas bactérias possuem forma vegetativa, estima-se que as bactérias lácticas foram inativadas e, como este produto não é passível de manipulação após o cozimento, não houve a contaminação cruzada por estes microrganismos. Sendo assim, considera-se que estes valores residuais de nitrato de sódio estão de acordo.

Todas as amostras de mortadela analisadas apresentaram valores residuais de nitrito de sódio de aproximadamente 55 mg / kg após 24h de armazenamento a 26 °C ± 1 °C. No 15º dia de armazenamento, estes valores já estavam na ordem de 10 mg / kg e no 90º dia de armazenamento atingiram a faixa entre 2 e 5 mg / kg (Figura 10). De acordo com Robach et al (1978), a combinação de um residual de 40 mg / kg de nitrito e de 0,2 % de ácido ascórbico é superior em relação a inibição da germinação de esporos de *C. botulinum* quando comparado a adição de 156 ppm de nitrito isoladamente. Entretanto, doses de 0,2% de ácido ascórbico não são possíveis de serem aplicados em mortadelas.

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada nº 272 de 14 de março de 2019 preconiza valores residuais máximos de nitrito em 150 mg / kg e a soma dos nitritos e nitratos, determinados como quantidade máxima residual, não deve superar 150 mg / kg, expressa como nitrito de sódio (BRASIL, 2019). Desta forma, a aplicação de 150 mg / kg de nitrito nas formulações usadas nos produtos deste foi adequada para atender ao regulamento nacional.

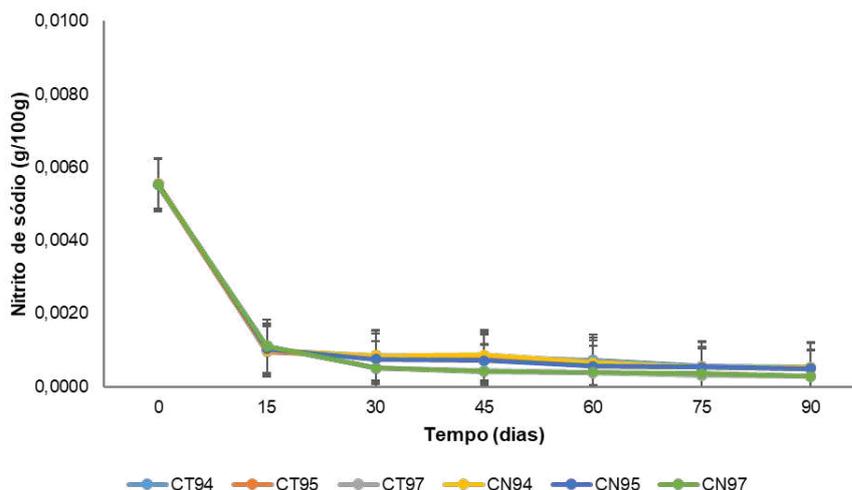


Figura 10. Valores médios de nitrito de sódio (g/100g) em mortadelas elaboradas com cura tradicional e cura natural durante o armazenamento a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 dias.

As amostras de mortadela analisadas não apresentaram crescimento de bactérias lácticas ($<1,0\text{ log UFC/g}$) durante a vida útil. Este resultado demonstra que o tratamento térmico aplicado no produto durante a etapa de cozimento foi capaz de inativar este microrganismo. Este resultado era esperado pelo grupo de pesquisa e de grande importância para a realização do teste de desafio com esporos de *C. sporogenes*, visto que as bactérias lácticas possuem a capacidade de produzir compostos com potencial antimicrobiano, como por exemplo as bacteriocinas, e estes compostos poderiam interferir no teste de desafio e inibir a germinação dos esporos de *C. sporogenes*. Neste caso o estudo poderia gerar um resultado falso positivo para a ação antimicrobiana do extrato vegetal.

Ao observar a Figura 11, podemos notar que os tratamentos CT97 e CN97 foram os únicos tratamentos que permitiram a germinação dos esporos de *C. sporogenes* durante a vida útil ($p < 0,05$). Assim, podemos verificar que a barreira da atividade de água também exerce um papel fundamental em relação a segurança microbiológica deste produto durante a vida útil. Em relação ao extrato vegetal, podemos verificar que as amostras elaboradas com o extrato vegetal tiveram seu comportamento similar às amostras elaboradas a partir do nitrito sintético.

Sebranek e Bacus (2007) relataram que a utilização de extratos vegetais ricos em nitrato, em conjunto com uma cultura starter redutora de nitrato, foi eficaz na produção de carnes processadas com características típicas de carnes curadas. Eles ressaltaram a importância de controlar a quantidade de nitrito gerada por esse processo. Além disso, foi relatado que a combinação de extratos vegetais, como o pó de aipo e o pó de acerola, que é rico em ácido ascórbico, reduz o nitrito com impacto mínimo no pH.

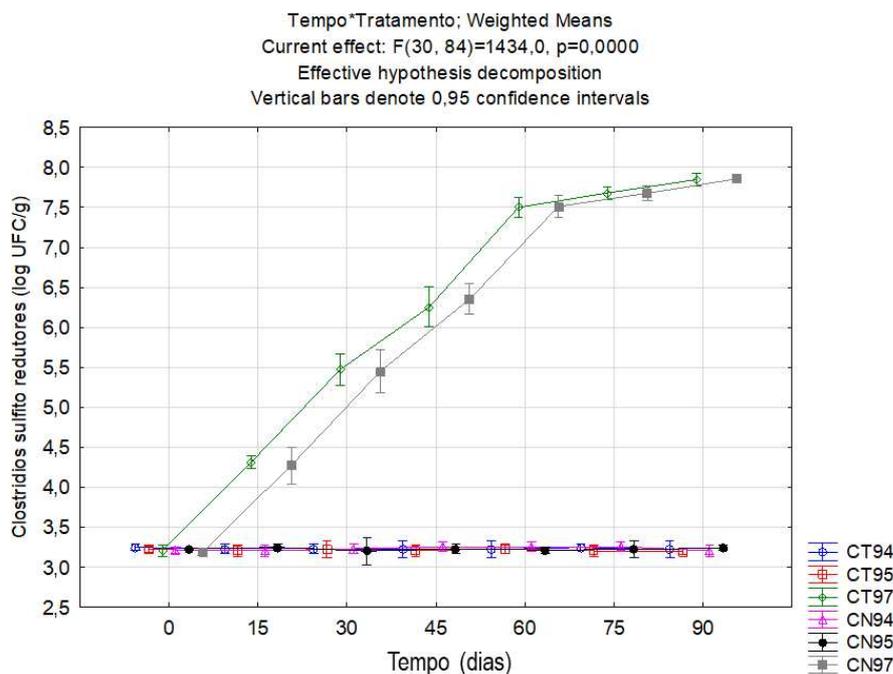


Figura 11. Valores médios da contagem de clostrídios sulfito redutores em mortadelas elaboradas com cura tradicional e cura natural durante o armazenamento a $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias.

Em um estudo realizado por KING et al. (2015) demonstrou que a combinação de 100 ppm de nitrito e de 547 ppm de ascorbato, independente se as fontes de obtenção eram sintéticas ou naturais, inibiram a germinação e o crescimento de cepas de *C. perfringens* durante a etapa de resfriamento de amostras de peito de peru inoculados artificialmente. Os demais tratamentos contendo somente nitrito ou ascorbato permitiram a germinação e o crescimento de cepas de *C. perfringens* após 2 h de resfriamento com temperaturas entre $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este trabalho demonstra a importância sobre o correto balanço entre os agentes de cura e os aceleradores de cura. Os aceleradores de cura, como eritorbato e ascorbato, são agentes antioxidantes que atuam para acelerar a formação de nitrosaminas através da depleção do nitrito. Sendo assim, o equilíbrio correto entre estes compostos e os agentes de cura é essencial para garantir a velocidade correta de depleção do nitrito e a manutenção dos aspectos sensoriais produtos cárneos (cor, sabor e odor), mas também a manutenção da segurança microbiológica dos produtos cárneos.

Djeri & Williams (2014) também reportaram que o nitrito obtido de suco de aipo pré-convertido inibiu a germinação e o crescimento de *C. botulinum* em amostras de mortadelas inoculadas artificialmente e armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 semanas.

Em um estudo conduzido por Juliatto (2015), foram preparadas mortadelas contendo nitrito de sódio (60 ppm e 120 ppm), eritorbato de sódio (1000 ppm) e lactato de sódio (0% e 1,2 %) em sua formulação. Um tratamento sem nitrito de sódio e sem lactato de

sódio foi usado como controle. Estas mortadelas foram inoculadas artificialmente com esporos de *C. sporogenes* e armazenadas a $28\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 60 dias. Foi observada a germinação dos esporos de *C. sporogenes* no 5º dia de armazenamento no tratamento sem nitrito de sódio e sem lactato de sódio, no 8º dia de armazenamento no tratamento contendo 60 ppm de nitrito de sódio e sem lactato de sódio, no 17º dia de armazenamento no tratamento contendo 60 ppm de nitrito de sódio e 1,2 % lactato de sódio, no 17º dia de armazenamento no tratamento contendo 120 ppm de nitrito de sódio e sem lactato de sódio e no 32º dia de armazenamento no tratamento contendo 120 ppm de nitrito de sódio e 1,2 % lactato de sódio. Os valores de atividade de água oscilaram entre 0,944 e 0.957. Estes resultados sugerem o sinergismo entre o valor adicionado de nitrito de sódio e o lactato de sódio para inibição da germinação de esporos de *C. sporogenes* em mortadelas armazenadas em temperaturas de 28°C. Estes dados corroboram com os resultados encontrados nesta pesquisa, onde os valores de atividade de água junto com o valor adicionado de nitrito no produto, independente da fonte de obtenção, possui um sinergismo para inibir a germinação de esporos de *C. sporogenes*. Um estudo conduzido por Aleixo (2014), foram preparadas mortadelas com nitrito de sódio (0 ppm e 150 ppm), sal (1,9 %) e sem lactato de sódio. As mortadelas foram preparadas, cozidas e após 24 h do cozimento porções de 25g foram transferidas para bolsas estéreis e inoculadas artificialmente com 4 log de esporos de *C. botulinum* tipo D. As mortadelas foram embaladas a vácuo e armazenadas a 4 °C durante 30 dias. Foi observado o crescimento de 1,23 log UFC/g de *C. botulinum* no tratamento sem nitrito de sódio após 30 dias de armazenamento, enquanto as mortadelas do tratamento com 150 ppm de nitrito de sódio apresentaram uma redução de 0,60 log UFC/g de *C. botulinum* no mesmo período de armazenamento. O autor não avaliou a atividade de água no estudo. Segundo NAACMCF (2010), em teses de desafio é necessário observar que ocorra um crescimento e/ou inativação de pelos menos 1 log UF/g para um ingrediente e/ou processo seja considerado efetivo. Oscilações abaixo de 1 log UF/g podem indicar oscilações referente ao método de inoculação, desvios de inoculação ou outros fatores externos. Sendo assim, é possível observar que as mortadelas com o tratamento contendo 150 ppm adicionado de nitrito de sódio se manteve estável durante o armazenamento a 4 °C durante 30 dias.

Golden et al. (2017) avaliaram a influência da composição do produto e da temperatura de armazenamento na produção de toxina por *C. botulinum*. Neste estudo, foram realizadas avaliações em refeições à base de carne, com e sem vegetais ou carboidratos, com valores de pH $\leq 5,7$ e $\geq 5,8$. Todas as amostras armazenadas a 25 °C apresentaram a produção de toxina botulínica após 72 h, enquanto as amostras armazenadas a 12,5 °C foram dependentes do valor de pH. As amostras com valores de pH

superiores a 5,8 apresentaram produção de toxina independentemente da temperatura de armazenamento. Cabe ressaltar que neste estudo as refeições à base de carne apresentaram valores de atividade de água entre 0,981 e 0,992.

Estes estudos demonstram que as barreiras de conservação dos produtos cárneos podem ou não apresentar sinergismo entre si. Os valores de pH, atividade de água, ingredientes e/ou etapas do processamento e armazenamento possuem um impacto direto na segurança microbiológica dos produtos cárneos. O desenvolvimento de novas tecnologias e ingredientes para a indústria cárnea deve levar em consideração as barreiras de inibição microbiana atuais, as condições de armazenamento e a microbiota do produto.

6. CONCLUSÕES

As massas cruas de mortadela estável em temperatura ambiente analisadas neste trabalho apresentaram uma prevalência de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas de 79 %, com contagens entre 0.3 NMP/g e $2,4 \times 10^2$ NMP/g. Esta mortadela, assim como outros produtos cárneos cozidos, possui condições de processamento e armazenamento muito diferentes de produtos similares produzidos em outros países, o que torna fundamental a avaliação da segurança microbiológica desta categoria de produtos no Brasil.

Dentre as 41 culturas isoladas a partir das massas de mortadela estável em temperatura ambiente, 17 % apresentaram características morfológicas similares ao *C. perfringens* e 7,3 % foram identificadas como *C. sporogenes*, conforme identificação molecular. As demais culturas (75,7 %) apresentaram semelhanças com outros gêneros de *Clostridium* spp., mas não foram identificadas neste projeto.

Ao avaliar a susceptibilidade destes esporos de bactérias anaeróbias mesófilas quanto aos obstáculos presentes em mortadelas estamos garantindo que os parâmetros de segurança microbiológicos atuais deste produto são efetivos e é possível produzir mortadelas estáveis em temperatura ambiente de uma forma segura.

Ao inovar na categoria de produtos cárneos através das tendências de *Clean Label* e, com isso modificar os parâmetros de segurança pré-definidos pela inclusão de um novo ingrediente, como por exemplo a substituição do nitrito sintético por um nitrito obtido a partir de extratos vegetais pré-convertidos, colocamos em questão a manutenção da segurança microbiológica destes produtos cárneos. Assim, observa-se neste estudo que as amostras de mortadela elaboradas com atividade de água $\leq 0,955$ e 150 ppm de nitrito adicionado, independente da fonte de origem sintética ou extrato vegetal, não apresentaram crescimento de *Clostridium sporogenes* quando armazenadas a 26°C durante 90 dias. Indicando, que os extratos vegetais avaliados neste estudo possuem o mesmo perfil de ação quando comparado ao nitrito sintético e podem ser considerados seguros do ponto de vista microbiológico, para a inibição do crescimento de esporos de *C. sporogenes* desde que os valores de atividade de água se mantenham iguais ou inferiores a 0,955.

Considera-se que os resultados desta pesquisa poderão contribuir para subsidiar novos estudos com outros agentes antimicrobianos alternativos para substituir o nitrito em produtos cárneos visando garantir o alimento seguro e a saúde do consumidor. Estudos complementares com abrangência nacional sobre a produção de compostos bioativos ou com potencial mutagênico e/ou carcinogênico a partir da síntese do nitrito obtido de fontes vegetais se fazem necessários, assim como, a possível regulamentação destes extratos vegetais a nível nacional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLE E.D.; FORREST, J.C.; GERRARD, D.E.; MILLS, E.W.; HEDRICK, H.B.; JUDGE, M.D.; MERKEL, R.A. 2001. **Principles of meat science**. 4th ed. Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt
- ADAMS, M. R., MOSES, M. O. **Food microbiology**. 3rd ed., p. 98–99, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Rotulagem nutricional de alimentos**. 2020. Disponível em https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/aprovada-norma-sobre-rotulagem-nutricional/apresentacao-rotulagem-nutricional_19a.pdf. Acessado em: 22 mai. de 2024.
- ALEIXO, G. C. **Efeito dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela**. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras. 2014.
- ALLAKER, R.P.; MENDEZ, L.S.; HARDIE, J.M.; BENJAMIN, N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on periodontal bacteria. **Oral Microbiology Immunology**. v. 16, p. 253–256, 2001.
- ALNOMAN, M.; UDOMPIJITKUL, P.; SABJA, D. P.; SARKER, M. R. The inhibitory effects of sorbate and benzoate against *Clostridium perfringens* type A isolates. **Food Microbiology**, v. 48, p. 89-98, 2015.
- AMSTALDEN, V. C. J.; SERRANO, A. M.; MANHANI, M. R. Avaliação da toxigênese de *C. botulinum* em mortadela e presunto. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 154-159, 1997.
- BARANY, J.; ROBERTS, T. A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 199-218, 1995.
- BLODGETT, R., 2006. Appendix 2 – Most Probable Number from Serial Dilutions. En: US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), **Bacteriological Analytical Manual Online**, Revision February 2006. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacteriological Analytical Manual BAM/default.htm>. Acessado em 27 jan. 18.
- BOIX, E.; COROLLER, L.; COUVERT, O.; PLANCHON, S.; VAN VLIET A. H.; BRUNT, J.; PECK, M. W.; RASETTI-ESCARGUEIL, C; LEMICHEZ, E.; POPOFF, M. R.; ANDRÉ, S. Synergistic interaction between pH and NaCl in the limits of germination and outgrowth of *Clostridium sporogenes* and Group I *Clostridium botulinum* vegetative cells and spores after heat treatment. **Food microbiology**, v. 106, p. 104055, 2022.
- BORCHERS, A.; TEUBER, S. S.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Food safety. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**. v. 39, p. 95–141, 2010.
- BRADBURY, M.; GREENFIELD, P., MIDGLEY, D., LI, D., TRAN-DINH, N., VRIESEKOOP, F., BROWN, J. L. Draft genome sequence of *Clostridium sporogenes* PA 3679, the common non-toxigenic surrogate for proteolytic *Clostridium botulinum*. **Journal of Bacteriology**. v.194, p.1631-1632, 2012
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa n° 4 de 31 de março de 2000. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de

carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça e de salsicha. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 5 abr. 2000, seção 1, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). **Manual para caracterização do risco dos estabelecimentos fabricantes e fracionadores de produtos para alimentação animal**. 3ª Edição, Brasília, 2022. Disponível em: < https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Inspe%C3%A7%C3%A3o-Animal/caracterizacao_risco_alimentacao_animal>, Acessado em: 22 mai. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. Instituir o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC a ser implantado, gradativamente nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do serviço de inspeção federal – SIF, de acordo com o manual genérico de procedimentos, anexo à presente portaria. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 10 de fev 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica do Botulismo – Brasil. 2014**. Disponível em:<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/30/Gr--ficos---Botulismo---2.pdf>>. Acesso em 14 de julho de 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Ofício-circular nº 005/2015/CGI/DIPOA/SDA**. Informações sobre registro do produto mortadela conservada em temperatura ambiente. Brasília, 27 de julho de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. 2th ed. Brasil. Brasília, DF: MAPA 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 6 de jul. de 2022, nº 126, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Botulismo, Brasil, 2006 a 2020**, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/b/botulismo/publicacoes/botulismo-brasil-2006-a-2020> >. Acessado em: 22 mai de 2024

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p.135-144, 2006.

BROWN, C. L.; HEDRICK, H. B.; BAILEY, M. E. Characteristics of cured ham as influenced by levels of sodium nitrite and sodium ascorbate. **Journal of Food Science** v. 39, p. 977–9, 1974.

BROWN, J. L; TRAN-DINH, N.; CHAPMAN, B. *Clostridium sporogenes* PA 3679 e seus usos na derivação de programações de processamento térmico para alimentos com baixa acidez estável em prateleiras e como modelo de pesquisa para o proteolítico *Clostridium botulinum*. **Journal of Food Protection**. v. 75: p. 779-792, 2012.

BROWN, S., et al. Integrating molecular techniques in the selection of indicator microorganisms for food safety testing. **Trends in Food Science & Technology**. v. 45, p. 50-65, 2022

CANON, F., NIDELET, T., GUÉDON, E., THIERRY, A., & GAGNAIRE, V. Understanding the mechanisms of positive microbial interactions that benefit lactic acid bacteria co-cultures. **Frontiers in Microbiology**. v. 11, p. 561347, 2020.

CARTER, A. T.; AUSTIN, J. W.; WEEDMARK, K. A.; PECK, M. W. Evolution of chromosomal *Clostridium botulinum* type E neurotoxin gene clusters: Evidence provided by their rare plasmid-borne counterparts. **Genome Biology and Evolution**. v. 8, p. 540–555, 2016.

CARTER, A. T.; PAUL, C. J.; MASON, D. R.; TWINE, S. M.; ALSTON, M. J.; LOGAN, S. M.; AUSTIN, J. W.; PECK, M. W. Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic *Clostridium botulinum*. **BMC Genomics**. v.10, p.115, 2009.

CARTER, A. T.; PECK, M. W. Genomes, neurotoxins and biology of *Clostridium botulinum* Group I and Group II. **Research in Microbiology**. v.166, p. 303–317, 2015.

CERESER, N.; COSTA, F. M. R.; JÚNIOR, O. D. R.; SILVA, D. A. R.; SPEROTTO, V. R. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 280-287, 2008. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000100049&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 10 de jun de 2019.

CHAKKA A. K.; SRIRAKSHA M. S.; RAVISHANKAR. C. N. Sustainability of emerging green non-thermal technologies in the food industry with food safety perspective: a review. **LWT - Food Science and Technology**. v. 151, p. 112140, 2021. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112140

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; 25th informational supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) System and Guidelines for its application. **Codex Alimentarius Commission Food Hygiene Basic Texts**. v. 4), 2003.

COLLINS, M. D.; LAWSON, P. A.; WILLEMS, A., CORDOBA, J. J.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 44, p. 812–826, 1994.

CREMONESI, P.; VANONI, L.; SILVETTI, T.; MORANDI, S.; BRASCA, M. Identification of *Clostridium beijerinckii*, *Cl. butyricum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. **Journal of Dairy Research**. v. 79, n. (3), p. 318-323, 2012.

CUI, H.; GABRIEL, A.A.; NAKANO, H. Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. **Food Control**. v. 21, p. 1030–1036, 2010.

DAINTY, R.H.; EDWARDS, R.A., HIBBARD, C.M. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. **Journal of Science Food and Agricultural**. v. 49, n. 4, p. 473-486, 1989.

DATAMARK. **Mortadela 2012 a 2023**. Disponível em: <http://www.datamark.com.br/>. Acessado em: 22 mai de 2024.

DE MEDICI, D.; ANNIBALLI, F.; WYATT, G. M.; LINDSTRÖM, M.; MESSELHÄUßER, U.; ALDUS, C. F.; FENICIA, L. Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin-producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6457-6461, 2009.

DELGADO-PANDO, G.; EKONOMOU, S. I.; STRATAKOS, A. C.; PINTADO, T. Clean label alternatives in meat products. **Foods**, v. 10, p. 1615, 2021.

DJERI, N. & WILLIAMS, S. K. Celery juice powder used as nitrite substitute in sliced vacuum-packaged turkey bologna stored at 4°C for 10 weeks under retail display light. **Journal of Food Quality**. v. 37, p. 361–370, 2014. Doi: 10.1111/jfq.12102.

DODDS, K. L.; AUSTIN, J. W. *Clostridium botulinum*. In: DOYLE, P.M.; BEUCHAT, R.L.; MONTVILLE, J.T. **Microbiologia de los Alimentos**, p.301-318, 2001.

DOGAN, O. B. **Implementation of Quantitative Microbial Risk Assessment and Predictive Microbiology Methods for Food Safety Assurance Applications**. 2021. PhD Thesis. The University of Nebraska-Lincoln.

DONG, Q.; TU, K.; GUO, L.; LI, H.; ZHAO, Y. Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions. **Food Microbiology**. v. 24, p. 624–632, 2007.

DOYLE, M. P. **Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages**. Food microbiology and food safety. New York: Springer; 2009.

DUARTE, R.S. **Microrganismos mais frequentemente encontrados com limites acima dos aceitáveis, segundo a RDC nº 12/2001 da ANVISA em produtos de origem animal, registrados juntos à CISPOA**. 2011. 42 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Annual report of the Scientific Network on Microbiological Risk Assessment**. 2023. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-8451>, Acessado em 22 mai de 2024.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the Request from the Commission related to the Effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. EFSA Journal 14 : 1 – 31 . EFSA . 2008 . Nitrate in vegetables . **EFSA Journal**. v. 689, p.1-79, 2003

FEINER, G. **Meat products handbook: Practical science and technology**. Woodhead Publishing, Cambridge. 2006. p.671.

FELLOWS, P.J. **Food Processing Technology: Principles and Practice**. Elsevier. 2009.

FLORES, M. & TOLDRÁ, F. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products-Invited review. **Meat Science**. v. 171, p. 108272, 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Food Safety Modernization Act (FSMA)** FDA, 2023. Disponível em: < <https://www.fda.gov/food/guidance-regulation-food-and-dietary-supplements/food-safety-modernization-act-fsma>>, Acessado em: 22 mai. De 2024.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Editora Atheneu, 1stª Edição, São Paulo, 2008. ISBN: 9788573791211.

FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Tests for groups of microorganisms. In: Wehr, H. M.; Frank, J.F. (Eds.), **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**, 17th ed. American Public Health Association, 2004. Chapter 8, Section 8.090 and 8.100, p. 239-242.

FUNG, F.; WANG, H.S.; MENON, S. Food safety in the 21st century. **Biomedical Journal**. v. 41, p. 88–95, 2018.

GARCIA, F., et al. Clean Labl Meat Processing: Technologies and Challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, p. 1026-1048, 2017

GARCIA, M., et al. Challenges in the selection of indicator microorganisms for food challenge studies. **Food Safety Journal**, v. 15, p. 210-225, 2020.

GELLI, D. S., JAKABI, M.; SOUZA, A. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo. v. 44, n. 6, p. 321-324, 2002.

GLASS, K. A., JOHNSON, E. A. Factors that contribute to the botulinal safety of reduced-fat and fat-free process cheese products. **Jounal of Food Protection**. v. 67, p. 1687–1693, 2004b.

GLASS, K. A.; JOHNSON, E. A. Antibotulinal activity of process cheese ingredients. **Jounal of Food Protection**. v. 67, p. 1765–1769, 2004a.

GLASS, K. A.; MAHNKE, M. P.; GOLDEN, M. C. Inhibition of *Clostridium perfringens* in High-Moisture, Uncured Turkey Products by Vinegar-Based Clean-Label Ingredients During Extended Cooling. **Meat and Muscle Biology**. v. 8, ed. 1, 2024.

GLASS, K.; MARSHALL, K. *Clostridium botulinum*. In: **Foodborne Infections and Intoxications**. 4^{ed}. USA: J. Glenn Morris, Jr e Morris E. Potter. v. 27, p. 371-387, 2013.

GOLDEN, M. C.; WANLESS, B. J.; DAVID, J. R. D.; LINEBACK, D. S.; TALLEY, R. J.; KOTTAPALLI, B., GLASS, K. A. Effect of Equilibrated pH and Indigenous Spoilage Microorganisms on the Inhibition of Proteolytic *Clostridium botulinum* Toxin Production in Experimental Meals under Temperature Abuse. **Journal of Food Protection**. v. 80, p. 1252-1258, 2017.

GÓMEZ-TORRES, N.; DUNNE, M.; GARDE, S.; MEIJERS, R.; NARBAD, A.; ÁVILA, M.; MAYER, M. J. Development of a specific fluorescent phage endolysin for in situ detection of *Clostridium* species associated with cheese spoilage. **Microbial Biotechnology**, v. 11, p., 332-345, 2018.

GRAY, J.I.; MACDONALD, B.; PEARSON, A.M.; MORTON, I.D. Role of nitrite in cured meat flavor: a review. **Journal of Food Protection**. v. 44, p. 302–12, 1981.

GREENBERG, R. A.; TOMPKIN, R. B; BLADEL, B. O.; KITTAKA, R. S.; ANELLIS, A. Incidence of mesophilic *Clostridium* spores in raw pork, beef, and chicken in processing plants in the United States and Canada. Swift & Company, Research and Development Center, **Applied Microbiology**, v. 14, n. 5, 1966.

GREVER , A. B. G. & RUITER, A. Prevention of clostridium outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite and nitrate . **European Food Research Technology**. v. 213, p. 165 – 169, 2001.

GRIFFITH, C. J.; LIVESEY, K. M.; CLAYTON, D. A. Food safety culture: The evolution of an emerging risk factor? **British Food Journal**, v. 112, p. 426–438, 2010. <https://doi.org/10.1108/00070701011034439>

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.; INADA, M.; BALBIN, M.; FUEYO, A.; PITIOT, A. S.; ASTUDILLO, A.; HIROSE, K.; HIRATA, M.; SHAPIRO, S. D.; NOËL, A.; WERB, Z.; KRANE,

S. M.; OTÍN, C. L.; PUENTE, X. S. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). **FASEB Journal**. v. 21, p. 2580–2591, 2007.

HALDANE, J. The red color of salted meat. **Journal of Hygiene**. v. 1, p. 115 – 122, 1901.

HATHEWAY, C. L. *Clostridium botulinum* and other clostridia that produce botulinum neurotoxin. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 5, p. 277–295, 1992.

HAUSCHILD, A. H. W. Epidemiology of human foodborne botulism. In A. H. W. HAUSCHILD AND K. L. DODDS. 1993. ***Clostridium botulinum: ecology and control in foods***. Marcel Dekker Inc., New York.

HE, H. J. & SUN, D. W. Microbial evaluation of raw and processed food products by Visible/Infrared, Raman and Fluorescence spectroscopy. **Trends in Food Science & Technology**. v. 46, p. 199-210, 2015.

HOAGLAND, R. Coloring matter of raw and cooked salted meats. **Journal of Agricultural Research III**. v. 3, p. 211-225, 1914.

HOAGLAND, R. The action of saltpeter upon the color of meat. In **25th Annual report of the Bureau Animal Industry**. Washington, D.C. : U.S. Department of Agriculture, Government Printing Office, 1910.

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**. v. 78, p. 68-76, 2008.

HOORFAR, J. Rapid Detection, Characterization, and Enumeration of Foodborne Pathogens. **AAPS Journal**. v. 13, p. 1-10, 2011.

HORSCH, A. M.; SEBRANEK, J. G.; DICKSON, J. S.; NIEBUHR, S. E.; LARSON, E. M.; LAVIERI, N. A.; WILSON, L. A. The effect of pH and nitrite concentration on the antimicrobial impact of celery juice concentrate compared with conventional sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. **Meat Science**. v. 96, n. 1, p. 400-407, 2014.

HOSPITAL, X.F.; HIERRO, E.; STRINGER, S.; FERNANDEZ, M. A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. **International Journal Food Microbiology**. 2016, v. 218, p. 66–70, 2016.

HOWE, J. L.; GULLETT, E. A; USBORNE, W. R. Development of pink color in cooked pork. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. v. 15, p. 19–23, 1982.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management**. Spring, 2nd ed, 2018.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance**. Spring, 1st ed, 2011.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Application of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality. Micro-organisms in foods**. v. 4, 1988.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 13721:1995/Cor 1:1996. **Meat and meat products** — Enumeration of lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 degrees C, Technical Corrigendum 1. 1996

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 16649-2:2001. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. 2001

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 21528-2:2017. **Microbiology of the Food Chain Horizontal** – Methods for the Detection and Enumeration of Enterobacteriaceae-Part 2:Colony-count Technique. 2017

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 6579-1:2017/Amd 1:2020. **Microbiology of the food chain** — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp. Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV and SC. 2020

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 6888-1:2021. **Microbiology of the food chain** — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). 2021

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). 7937:2004. **Microbiology of food and animal feeding stuffs** — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique. 2004

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Food safety management systems—Requirements for any organization in the food chain**. BS EN ISO, 22000, 2005.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000.

JESPERSEN, L. & WALLACE, C. A. Triangulation and the importance of establishing valid methods for food safety culture evaluation. **Food Research International**, v. 100, p. 244–253, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.009>

JO, K.; LEE, S.; YONG, H.I.; CHOI, Y.-S.; JUNG, S. Nitrite sources for cured meat products, **LWT Food Science and Technology**. 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109583>.

JOHNSON, R. & BROWN, S. Clean Label Trends and Their Impact on the Meat Industry. **Meat Science**. v. 154, p. 108-115, 2019.

JULIATTO, R. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias combinados com nitrito de sódio e lactato de sódio na germinação de esporos de *Clostridium sporogenes***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

KAMBOJ, S.; GUPTA, N., BANDRAL, J. D.; GANDOTRA, G.; ANJUM, N. Food safety and hygiene: **A Review International Journal of Chemical Studies**. v. 8, n. 2, p. 358-368, 2020.

KANNER, J. 1994. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**. v. 36, p. 169-189, 1994.

KING, A. M.; GLASS, K. A.; MILKOWSKI, A. L.; SINDELAR, J., Comparison of the Effect of Curing Ingredients Derived from Purified and Natural Sources on Inhibition of *Clostridium perfringens* Outgrowth during Cooling of Deli-Style Turkey Breast. **Journal of Food Protection**. v. 78, p. 1527-35, 2015.

KING, T.; COLE, M.; FARBER, J.M.; EISENBRAND, G.; ZABARAS, D.; FOX, E.M.; HILL, J. P. Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety **Trends in Food Science & Technology**. v. 68, p. 160-175, 2017.

KRISPIEN, K.; RÖDEL, W.; LEISTNER, L. Vorschlag zur Berechnung der Wasseraktivität (a_w – Wert) von Fleischerzeugnissen aus den Gehalten von Wasser und **Kochsalz**. **Fleischwirtsch**, v. 59, n. 8, p. 1173-1177, 1979.

KUMAR, S.; PEDERSEN-WISMER, J.; CASPERSEN, C. Effect of raw materials, deboning methods and chemical additives on microbial quality of mechanically deboned poultry meat during frozen storage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 23, n. 4, p. 217-220, 1986.

KUREK, M. A.; ONOPIUK, A.; POGORZELSKA-NOWICKA, E.; SZPICER, A.; ZALEWSKA, M.; PÓŁTORAK, A. Novel protein sources for applications in meat-alternative products. **Insight and challenges Foods**. v. 11, p. 957, 2022.

LANDRY, A.P.; DUAN, X.; HUANG, H.; DIMG, H. Iron–sulfur proteins are the major source of protein-bound dinitrosyl iron complexes formed in *Escherichia coli* cells under nitric oxide stress. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 50, p. 1582–1590, 2011.

LEHMANN, K. B. Über das Haemorrhodin. Ein neues weit verbreitetes Blutfarbstoffderivat. **Über Phys. Med. Gesellschaft Würzburg**. v. 4, p. 57 – 61, 1899.

LIDON, F. & SILVESTRE, M. M. **Conservação de Alimentos. Princípios e Metodologias**, 1ª edição. Lisboa: Escolar Editora, 2008.

LIM, S.-C.; FOSTER, N.F.; RILEY, T.V. Susceptibility of *Clostridium difficile* to the food preservatives sodium nitrite, sodium nitrate and sodium metabisulphite. **Anaerobe**. v. 37, p. 67–71, 2016.

LUNING, P. A.; JACXSENS, L.; ROVIRA, J.; OSES, S. M.; UYTENDAELE, M.; Marcelis, W. J. A concurrent diagnosis of microbiological food safety output and food safety management system performance: Cases from meat processing industries. **Food Control**. v. 22, p. 555–565, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.003>

MAH, J. H.; KANG, D. H.; TANG J. Comparison of viability and heat resistance of *Clostridium sporogenes* stored at different temperatures. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. M23-7, 2009.

MAJOU, D.; CHRISTIEANS, S. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. **Meat Science**. v. 145, p. 273–284, 2018.

MANNING, L.; LUNING, P. A.; WALLACE, C. A. The evolution and cultural framing of food safety management systems-where from and where next ?. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 18, p. 1770-1792, 2019.

MAZZOTTA, A. S.; CRANDALL, A. D.; MONTVILLE, T. J.; Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2654–2659, 1997.

MCCLURE, P. J. Spore-forming bacteria. In: BLACKBURN, **Food spoilage microorganisms**, v.21, 2006. Woodhead Publishing, Sawston, United Kingdom.

MELO, N. R.; SOARES, N. F. F.; GONÇALVES, M. P. J. C. Nisina: Um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**. v. 52, n. 304, p. 921-938, 2005.

MEYER, J. D.; CERVENY, J. G.; LUCHANSKY, J. B. Inhibition of nonproteolytic, psychrotrophic clostridia and anaerobic sporeformers by sodium diacetate and sodium lactate in cook-in-bag turkey breast. **Journal Food Protection**. v. 66, n. 8, p. 1474-1478, 2003.

MILKOWSKI, A.; GARG, H.K.; COUGHLIN, J.R.; BRYAN, N.S. Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk–benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. **Nitric Oxide**. v. 22, p. 110–119, 2010.

MILLER, A. J.; CALL, J. E.; WHITING, R. C. Comparison of organic acid salts for *Clostridium botulinum* control in an uncured turkey product. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 958-962, 1993.

MORALES, P. & FLORES, M. Food products and by-products: Nutraceuticals and novel foods. **Food Engineering: Integrated Approaches**. p. 239-254, 2016.

MORTIMORE, S. E. & WALLACE, C. A. **HACCP — A practical approach**, 2nd ed., 1998. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers.

MORTIMORE, S. E. & WALLACE, C. A. **HACCP: A food industry briefing**. 2015. London, UK: John Wiley & Sons

MOYE, Z.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. 2018. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. **Viruses**. V.10, p.205.

MYERS, K.; CANNON, J.; MONTOYA, D.; DICKSON, J.; LONERGAN, S.; SEBRANEK, J. Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable-based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. **Meat Science**. v. 94, p. 69–76, 2013.

NAABER, P., SMIDT, I., ŠTŠEPETOVA, J., BRILENE, T., ANNUK, H., & MIKELSAAR, M. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal Lactobacillus species. *Journal of medical microbiology*. v. 53, n. 6, p. 551-554, 2004.

NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS – NAACMCF. Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. **Journal of Food Protection**. v. 73, p. 140–202, 2010.

NIEMIRA, B. A. Cold Plasma: A Powerful New Tool for Safe and Sustainable Fresh Produce Decontamination. **Food Microbiology**. v. 25, p. 626-631, 2008.

PAPAMANOLI, E.; TSIGARIDA, E.; KOTZEKIDOU, P. Incidence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* in the food chain. **Foods**. v. 5, p. 1684-1699, 2011.

PARDO, G. & ZUFÍA, J. Life cycle assessment of food-preservation technologies. **Journal of Cleaner Production**, v. 28, p. 198–207, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.10.016>

PAREDES-SABJA, D.; TORRES, J. A.; SETLOW, P.; SARKER, M. R. *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. **Journal of Bacteriology**. v. 190, p. 1190-1201, 2008.

PARKS, L. L. & CARPENTER, J. A. Functionality of six non meat proteins in meat emulsion systems. **Journal of Food Science**. v. 2, n. 2, p. 271-274, 1987. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06590.x>

- PARTHASARATHY, D.K.; BRYAN, N.S. Sodium nitrite: The “cure” for nitric oxide insufficiency. **Meat Science**. v. 92, 274–279, 2012.
- PATEL, R. et al. Recent advances in the identification of indicator microorganisms for food challenge testing. **Food Microbiology Reviews**. v. 38, n. 4, p. 301-315, 2021.
- PEARSON, A.M. & TAUBER, F.W. **Processed meats**. 2nd ed., 1984. New York: Van Nostrand Reinhold.
- PECK, M. W. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. **Advances in Microbial Physiology**. v. 55, p. 183–265, 2009.
- PECK, M. W.; SMITH, T. J.; ANNIBALLI, F.; AUSTIN, J. W.; BANO, L.; BRADSHAW, M.; CUERVO, P.; CHENG, L. W.; DERMAN, Y.; DORNER, B. G. **Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature**. **Toxins**. v. 9, p. 38, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9010038>
- PECK, M. W.; STRINGER, S. C.; CARTER, A. T. *Clostridium botulinum* in the postgenomic era. **Food Microbiology**. v. 28, p. 183–191, 2011.
- PETTINATI, T. D. Microwave oven method for rapid determination of moisture in meat. **Journal of AOAC International**, v. 58, n. 6, p. 1188-1193, 1975.
- PIERSON, M.D.; SMOOT, L.A.; ROBACH, M.C. Nitrite, nitrite alternatives, and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 17, p. 141–187, 1983.
- PIVNICK, H.; BARNETT, H. W.; NORDIN, H. R.; RUBIN, L. J. Factors affecting the safety of canned, cured, shelf-stable luncheon meat inoculated with *Clostridium botulinum*. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 2, p. 141-148, 1969.
- POLENSKE, E. 1891 . Ü ber den Verlust, welchen Rindfl eisch und N ä hrwert durch das P ö keln erleidet sowie ü ber die Ver ä nderungen salpeterhaltiger P ö kellaken. **Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt**. v. 7, p. 471 – 474, 1891.
- POURAZRANG, H.; MOAZZAMI, A.; BAZZAZ, B.F. Inhibition of mutagenic N-nitroso compound formation in sausage samples by using L-ascorbic acid and α -tocopherol. **Meat Science**. v. 62, p. 479–483, 2002.
- PROLO, C.; ÁLVAREZ, M.N.; RADI, R. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. **Biofactors**. v. 40, p. 215–225, 2014.
- RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücler, Instituto Mauá de Tecnologia. p. 184, 2004.
- ROBACH, M. C.; IVEY, F. J.; HICKEY, C. S. System for evaluating clostridial inhibition in cured meat products. **Applied and Environmental Microbiology**, 1978, v.36, n.1, p.210-211.
- RUUSUNEN, M. & PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. **Meat Science**. v. 70, n. 3, p. 531-541, 2005.
- SABAH, J. R.; THIPPAREDDI, H.; MARSDEN, J. L.; FUNG, D. Y. C. Use of organic acids for the control of *Clostridium perfringens* in cooked vacuum-packaged restructured roast beef

during an alternative cooling Procedure. **Journal of Food Protection**. v. 66, p. 1408-1412, 2003. Doi:<<https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1408>

SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M. L. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association; 2015.

SÁNCHEZ-ALDANA, D.; GALICIA-GARCÍA, T.; LEAL-RAMOS, M. Y. Microbiological quality and food safety challenges in the meat industry. **Food Microbiology and Biotechnology**. v. 85, p. 102, 2020.

SANCHEZ-ECHANIZ, J.; BENITO-FERNÁNDEZ, J.; MINTEGUI-RASO, S. Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. **Pediatrics**. v. 107, p. 1024–1028, 2001.

SBARDELOTTO, P. R.; BALBINOT-ALFARO, E.; DA ROCHA, M.; ALFARO, A. T. Natural alternatives for processed meat: Legislation, markets, consumers, opportunities and challenges. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 63, n. 30, p. 10303-10318, 2023.

SCANNELL, A.G.; SCHWARZ, G.; HILL, C.; ROSS, R.P.; ARENDT, E.K. Pre-inoculation enrichment procedure enhances the performance of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* meat starter culture. **International Journal of Food Microbiology**. v. 64, p. 151–159, 2001.

SEBAIHIA, M.; PECK, M. W.; MINTON, N. P.; THOMSON, N. R.; HOLDEN, M. T.; MITCHELL, W. J.; CARTER, A. T.; BENTLEY, S. D.; MASON, D. R.; CROSSMAN, L. Genome sequence of a proteolytic (group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. **Genome Research**. v. 17, p. 1082–1092, 2007.

SEBRANEK, J. G. & BACUS, J. N.. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science*. v. 77, n. 1, p. 136-147, 2007.

SEBRANEK, J.G. & FOX, J.B. A review of nitrite and chloride chemistry: interactions and implications for cured meats. **Journal Science of Food Agriculture**. v. 36, p. 1169–82, 1985.

SHAKIL, M. H., TRISHA, A. T., RAHMAN, M., TALUKDAR, S., KOBUN, R., HUDA, N., & ZZAMAN, W. Nitrites in cured meats, health risk issues, alternatives to nitrites: A review. **Foods**. v. 11, ed. 21, p. 3355, 2022.

SILVA, E. G. & MARTINEZ, L. Clean Label Ingredients in Meat Products: A Review. **Food Chemistry**. v. 302, p. 125327, 2020.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5th ed., 2017. Blucher, São Paulo

SILVER, L. & BASSETT, M. Food safety for the 21st century. **JAMA**. v. 300, p. 957e9, 2008.

SMITH, A. B. & JONES, C. D. Clean Label Meat Products: Consumer Perceptions and Market Trends. **Journal of Food Science**. v. 86, n. 5, p. 1567-1575, 2021.

SMITH, J. & JONES, A. Selecting appropriate indicator organisms for food challenge testing. **Journal of Food Microbiology**. v. 25, n. 2, p. 123-135, 2019

SMITH, L. D. S. **Clostridia. In Medical Microbiology.** 8th ed., 2018. University of Texas Medical Branch at Galveston.

SOFOS, J. N. Challenges to Meat Safety in the 21st Century. **Meat Science.** v. 86, n. 1, p. 189-195, 2010.

STRINGER, S. C.; ALDUS, C. F.; PECK, M. W. Demonstration of the safe shelf-life of fresh meat with respect to non-proteolytic *Clostridium botulinum*. **Institute of Food Research**, 2011. Disponível em: <http://pork.ahdb.org.uk/media/72703/demonstration-of-the-safe-shelf-life-of-fresh-meat-with-respect-to-non-proteolytic-clostridium-botulinum-final-report.pdf>, Acessado em: 19 mar de 2022.

STRINGER, S. C.; CARTER, A. T.; WEBB, M. D.; WACHNICKA, E.; CROSSMAN, L. C.; SEBAIHIA, M.; PECK, M. W. Genomic and physiological variability within group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum*. **BMC Genomics.** v. 14, p. 333, 2013.

SUGIYAMA, H. 1980. *Clostridium botulinum* neurotoxin. **Microbiology Reviews.** ed.44, p.419–448.

TAN, Y. Q; ONG, H. C.; YONG, A. M. H.; FATTORI, V.; MUKHERJEE, K. Addressing the safety of new food sources and production systems. **Comprehensive Review In Food Science and Food Safety.** v.23, 2024. Doi: <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.13341>>

TAYLOR, R. H., DUNN, M. L., OGDEN, L. V., JEFFERIES, L. K., EGGETT, D. L., STEELE, F. M. Conditions associated with *Clostridium sporogenes* growth as a surrogate for *Clostridium botulinum* in nonthermally processed canned butter. **Journal of Dairy Science.** v. 96, p. 2754–2764, 2013. Doi:<<https://doi.org/10.3168/jds.2012-6209>>.

TIAN, Y., GAO, X., QI, W. L., WANG, Y., WANG, X., ZHOU, J., CHEN, B. Advances in differentiation and identification of foodborne bacteria using near infrared spectroscopy. **Analytical Methods.** v. 13, n. 23, p. 2558-2566, 2021.

TOLDRÁ, F. Nitrate reduction and nitrite uptake by meat during curing. **Nitrates and Nitrites in Food and Water.** Springer, Boston, MA. p. 341-351, 2006.

TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins – Implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**, 2005, v.70, n.3, p.493-508.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W.; DE HAAS, P. E.; SOLL, D. R.; VAN EMBDEN, J. D. The occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains; evaluation of IS-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 29, p. 2578-2586, 1991.

VASAVADA, M. N. & CORNFORTH, D. P. Evaluation of milk mineral antioxidant activity in meat balls and nitrite-cured sausage. **Journal of Food Science.** v. 70, p. 250–3, 2005.

VASAVADA, M.N. & CORNFORTH, D.P. Evaluation of milk mineral antioxidant activity in meat balls and nitrite-cured sausage. **Journal of Food Science.** v. 70, p. 250–253, 2005.

VIDAL, V. A., LORENZO, J. M., MUNEKATA, P. E., POLLONIO, M. A. Challenges to reduce or replace NaCl by chloride salts in meat products made from whole pieces—a review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition.** v. 61, n. 13, p. 2194-2206, 2021.

WANG, Y., et al. Clean Label Preservation Techniques in Meat Products: A Review. **Trends in Food Science & Technology.** v. 75, p. 78-87, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. **Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015**; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015.

WU, Q.; LI, C.; LI, C.; CHEN, H.; SHULIANG, L. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 160, p. 129–139, 2010.

ZANARDI, E.; DAZZI, G.; MADARENA, G.; CHIZZOLINI, R. Comparative study on nitrite and nitrate ions determination. **Annali Della Facolta' Di Medicina Veterinaria Di Parma**. v. 22, p. 70–86, 2002.

ZHU, Y.; ZHANG, J.; LI, M.; REN, H.; ZHU, C.; YAN, L.; ZHANG, Q. Near-infrared spectroscopy coupled with chemometrics algorithms for the quantitative determination of the germinability of *Clostridium perfringens* in four different matrices. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 232, p. 117997, 2020.