



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

SUZANA ERI YOTSUYANAGI

SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE MORTADELA COMERCIALIZADA EM
TEMPERATURA AMBIENTE INOCULADA COM *Clostridium sporogenes*

CAMPINAS

2021

SUZANA ERI YOTSUYANAGI

SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE MORTADELA COMERCIALIZADA EM
TEMPERATURA AMBIENTE INOCULADA COM *Clostridium sporogenes*

Tese 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 Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: MARISTELA DA SILVA DO NASCIMENTO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA SUZANA ERI
YOTSUYANAGI, E ORIENTADA PELA
PROFESSORA DRA. MARISTELA DA
SILVA DO NASCIMENTO.

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Y83s Yotsuyanagi, Suzana Eri, 1987-
Segurança microbiológica de mortadela comercializada em temperatura ambiente inoculada com Clostridium sporogenes / Suzana Eri Yotsuyanagi. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Maristela da Silva do Nascimento.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Botulismo. 2. Produtos cárneos. 3. Sorbato de potássio. 4. Inocuidade dos alimentos. I. Nascimento, Maristela da Silva do. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Microbiological safety of mortadella marketed at room temperature inoculated with Clostridium sporogenes

Palavras-chave em inglês:

Botulism

Meat products

Potassium sorbate

Food safety

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Doutora em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Maristela da Silva do Nascimento [Orientador]

Anderson de Souza Sant'Ana

Luciana Miyagusku

Luciano Molognoni

Marcia Mayumi Harada Hagiwara

Data de defesa: 24-05-2021

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6572-2678>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6682401498643791>

Comissão examinadora

Profa. Dra. Maristela da Silva do Nascimento
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Presidente da Banca (Orientadora)

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
(Membro Titular)

Profa. Dra. Luciana Miyagusku
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
(Membro Titular)

Dr. Luciano Molognoni
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
(Membro Titular)

Dra. Marcia Mayumi Harada Hagiwara
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(Membro Titular)

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

Dedico o trabalho a todos que me motivaram e incentivaram a iniciar o projeto e principalmente a finalizar o mesmo.

Aos meus pais, Katumi e Neusa, que sempre tiveram preocupação de me fomentarem com uma boa educação, gratidão por toda paciência e dedicação.

Ao meu marido, Eduardo, por sempre apoiar minhas decisões na vida profissional e por cuidar com tanto carinho das nossas filhas, o que sempre me permitiu ficar tranquila nos momentos em que não pude dar a devida atenção a elas.

Às minhas filhas, Alice e Luiza, as palavras são limitadas para expressar a gratidão por tê-las em minha vida, obrigada por todos os ensinamentos e alegria que vocês me proporcionam.

À Ana Lúcia, a qual tenho grande estima por ter contribuído de forma ativa no meu desenvolvimento profissional e conseqüentemente pessoal.

AGRADECIMENTOS

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

À toda equipe do CTC (Centro de Tecnologia de Carnes) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pela oportunidade e apoio de desenvolvimento do projeto.

À Dra. Ana Lúcia Lemos pelas longas conversas sobre as hipóteses que cercam o tema do presente projeto e principalmente por me instigar a tantas dúvidas produtivas sobre o estudo.

À Dra. Maristela da Silva do Nascimento pela orientação do presente projeto.

À FEA/UNICAMP pela oportunidade de realizar o doutorado.

RESUMO

O *Clostridium botulinum* é um micro-organismo Gram positivo, formador de esporo termorresistente e agente etiológico do botulismo alimentar, uma intoxicação causada pela ingestão de alimentos contendo a neurotoxina botulínica. Dos casos de botulismo alimentar notificados e confirmados de 1999 a 2014 no Brasil, a mortadela foi o alimento mais relacionado com a doença. Deste modo, a mortadela comercializada em temperatura ambiente pode ser um produto susceptível à contaminação por *C. botulinum* do Grupo I proteolítico e outros patógenos. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar parâmetros que garantam a estabilidade e segurança microbiológica de mortadela. Os parâmetros estudados foram atividade de água (a_w), substituição de NaCl por KCl, efeito antimicrobiano do eritorbato e sua interação com o nitrito e efeito antimicrobiano do sorbato. As amostras foram processadas e inoculadas com *C. sporogenes* PA 3679, utilizado como *surrogate* do *C. botulinum* do Grupo I proteolítico, para avaliar o desenvolvimento deste micro-organismo frente aos parâmetros estudados neste projeto. A composição centesimal (umidade, proteína, gordura, cinzas e açúcares totais) e a atividade de água foram analisadas no primeiro dia pós-processamento das amostras. No estudo de vida útil foram realizadas análises microbiológicas (bactérias lácticas, enterobactérias, mesófilos aeróbios, esporos e células vegetativas de clostridio sulfito redutor), pH e nitrito nos dias 1, 15, 30 60 e 90. As amostras foram armazenadas em câmara a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 80%. Os resultados do estudo do efeito do eritorbato e nitrito residual indicam que a a_w foi o fator intrínseco preponderante ($p \leq 0,05$) para o controle de *C. sporogenes* PA 3679, sendo que o nitrito e o eritorbato não proporcionaram efeito antimicrobiano adicional. O estudo do efeito do sorbato demonstrou que a a_w e o sorbato apresentam efeito ($p \leq 0,05$) contra a germinação e crescimento de *C. sporogenes*. Ademais a substituição do cloreto de sódio por cloreto de potássio não apresenta um efeito antimicrobiano equivalente sobre o *C. sporogenes* quando adicionado na mesma base molar. Os resultados desse estudo poderão auxiliar na avaliação e melhora dos critérios estabelecidos para mortadela comercializada em temperatura

ambiente, de forma a aumentar a segurança microbiológica do produto em relação ao *C. botulinum* e aos micro-organismos deteriorantes.

Palavras-chave: botulismo, produtos cárneos, sorbato de potássio, inocuidade dos alimentos.

ABSTRACT

Clostridium botulinum is a Gram positive microorganism, a thermoresistant spore and etiological agent of food botulism, an intoxication caused by the ingestion of foods containing the botulinum neurotoxin. Among the reported cases of food botulism notified and confirmed from 1999 to 2014 in Brasil, mortadella was the food most related to the disease. Thus, shelf stable mortadella can be a product susceptible to contamination by *C. botulinum* from Group I proteolytic and other pathogens. The objective of the study was to evaluate parameters that impact the microbiological stability and safety of this product. The parameters studied were water activity, replacement of NaCl by KCl, antimicrobial effect of erythorbate and its interaction with nitrite and antimicrobial effect of sorbate. The samples were processed and inoculated with *C. sporogenes* PA 3679 as a surrogate for *C. botulinum* from Group I proteolytic to evaluate the development of this microorganism against the parameters studied in this project. The proximate composition (moisture, protein, fat, ash and total sugars) and water activity were analyzed one day after the samples were processed. In the study of shelf life (1, 15, 30, 60 and 90 days), microbiological analyzes were performed (lactic acid bacteria, enterobacteria, aerobic mesophiles, spores and vegetative cells of reducing clostridium sulfite), pH and nitrite. The samples were stored in a chamber at $26 \pm 1^\circ\text{C}$ and 80% relative humidity. The results of the effect of erythorbate and residual nitrite indicate that a_w was the predominant intrinsic factor for the control of *C. sporogenes* PA 3679, whereas nitrite and erythorbate did not provide an additional antimicrobial effect. The study of the effect of sorbate demonstrated that a_w and sorbate have an effect against the germination and growth of *C. sporogenes*. Furthermore, the substitution of sodium chloride for potassium chloride may not have an equivalent antimicrobial effect on *C. sporogenes* when added on the same molar base. The results of this study may contribute in the evaluation and improvement of the criteria established for shelf stable mortadella, in order to increase the microbiological safety of the product in relation to *C. botulinum* and to the spoilage microorganisms.

Keywords: botulism, meat product, sorbate, food safety.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 <i>Objetivo geral</i>	16
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	16
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 1.....	20
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
1. <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>	21
2. SURTOS DE BOTULISMO RELACIONADOS A PRODUTOS CÁRNEOS.....	27
3. UTILIZAÇÃO DE <i>C. SPOROGENES</i> COMO SUBSTITUTO DO <i>C. BOTULINUM</i> DO GRUPO I PROTEOLÍTICO.....	28
4. MORTADELA DE BAIXO CUSTO COMERCIALIZADA EM TEMPERATURA AMBIENTE...	30
5. EFEITO DA TEMPERATURA DE ESTOCAGEM SOBRE O <i>C. BOTULINUM</i>	32
6. SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DE NaCl POR KCl EM PRODUTOS CÁRNEOS.....	33
7. AÇÃO ANTIMICROBIANA DO NITRITO E ANTIOXIDANTES EM PRODUTOS CÁRNEOS	34
8. SORBATO: AÇÃO ANTIMICROBIANA EM PRODUTOS CÁRNEOS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
CAPÍTULO 2.....	47
EFEITO DO ERITORBATO E NITRITO RESIDUAL NA ESTABILIDADE E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA FRENTE AO <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i> PA 3679 EM MORTADELA COMERCIALIZADA EM TEMPERATURA AMBIENTE.....	47

1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 <i>Preparo do inóculo e inoculação das amostras</i>	51
2.2 <i>Processamento das amostras de mortadela</i>	52
2.3 <i>Análises microbiológicas</i>	55
2.4 <i>Análises físico-químicas</i>	56
2.5 <i>Análise estatística</i>	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4. CONCLUSÕES.....	63
5. REFERÊNCIAS	64
CAPÍTULO 3	68
EFEITO DO SORBATO DE SÓDIO NA ESTABILIDADE E SEGURANÇA	
MICROBIOLÓGICA DE MORTADELA COMERCIALIZADA EM	
TEMPERATURA AMBIENTE	68
1. INTRODUÇÃO.....	70
2. MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1. <i>Preparo do inóculo e inoculação das amostras</i>	72
2.2 <i>Processamento das amostras de mortadela</i>	73
2.3 <i>Análises microbiológicas</i>	75
2.4 <i>Análises físico-químicas</i>	76
2.5 <i>Análise estatística</i>	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4. CONCLUSÕES	83
6. REFERÊNCIAS	83

CAPÍTULO 4	87
EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO POR CLORETO DE POTÁSSIO NA ESTABILIDADE E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE MORTADELA COMERCIALIZADA EM TEMPERATURA AMBIENTE FRENTE AO <i>C. SPOROGENES</i> PA 3679	87
1. INTRODUÇÃO.....	89
2. MATERIAL E MÉTODOS	91
2.1 <i>Ajuste de atividade de água em sistema modelo de emulsão cárnea.</i>	91
2.2 TESTE DESAFIO COM SUBSTITUIÇÃO DE NaCl POR KCl EM MORTADELA ARMazenada sob temperatura de abuso.....	93
2.2.1 <i>Preparo do inóculo e inoculação das amostras</i>	93
2.2.2 <i>Processamento das amostras</i>	94
2.2.3 <i>Análises microbiológicas</i>	97
2.2.3 <i>Análises físico-químicas</i>	97
2.2.4 <i>Avaliação visual</i>	98
2.2.5 <i>Análise estatística</i>	98
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
3.1 <i>Teste desafio em mortadela comercializada em temperatura ambiente com substituição equimolar de NaCl por KCl</i>	98
4. CONCLUSÕES	106
5. REFERÊNCIAS	106
DISCUSSÃO GERAL.....	113
CONCLUSÃO GERAL	118

INTRODUÇÃO GERAL

Segundo a Instrução Normativa nº 4 de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2000), mortadela é o produto cárneo industrializado, obtido de uma emulsão de carnes de animais de açougue, acrescido ou não de toucinho, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial, em diferentes formas, e submetido ao tratamento térmico adequado. A Mortadela da categoria “sem denominação” pode conter até 60% de carnes mecanicamente separadas (CMS) e 10% de miúdos comestíveis de diferentes espécies de animais de açougue (estômago, língua, rim, fígado, miolo e coração), pele e tendões (Brasil, 2000). Quando formulada com estas porcentagens máximas de CMS e miúdos, caracterizamos o produto como mortadela de baixo custo no presente projeto. Já a Mortadela tipo Bologna pode conter até 20% de carne mecanicamente separada (CMS) e 10% de miúdos, enquanto a Mortadela de carne de aves pode conter 40% de CMS e 5% de miúdos e as Mortadelas Italiana e Bologna não podem conter CMS e miúdos.

Dentro da categoria “sem denominação”, está incluída a mortadela comercializada em temperatura ambiente, que recebeu destaque no país, no ano de 2015, a partir do momento em que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) alertou sobre o risco de botulismo vinculado ao produto. No Brasil foram registrados 83 casos de botulismo de 1999 a 2014, porém, estima-se que um grande número de casos suspeitos não tenha sido confirmado ou notificado. Dos casos confirmados, 55% foram vinculados a produtos industrializados/comerciais, sendo a mortadela o produto com maior ocorrência (Brasil, 2015).

Como mencionado anteriormente, as mortadelas de baixo custo contêm em sua formulação miúdos e alta concentração de CMS. Ressalta-se que, as características físico-químicas e microbiológicas da CMS e dos miúdos diferem da carne. Uma vez que muitos miúdos ofertados para o consumo humano e utilizados como matéria prima de produtos apresentam elevadas contagens de microorganismos (Gill e Jones, 1992). Em relação à CMS, o processo de separação mecânica ocasiona trituração dos ossos e consequente liberação da

medula, rompendo células e tornando a CMS um meio favorável a reações bioquímicas e ao desenvolvimento de micro-organismos (Brasil, 2000).

Portanto, analisando-se a composição da matéria-prima, compreende-se que o tipo de mortadela que proporcionaria maior condição de contaminação e desenvolvimento microbiano seria a mortadela com adição dos teores máximos de CMS e miúdos, caracterizada como mortadela de baixo custo. Além destas características, a mortadela de baixo custo quando comercializada em temperatura ambiente apresenta fatores adicionais favoráveis ao crescimento e produção de toxina por *Clostridium Botulinum* (*C. Botulinum*), tais como: pH ao redor de 6,2, concentração de NaCl de 4%, condição de anaerobiose propiciada pelo envoltório plástico impermeável e tratamento térmico caracterizado como pasteurização (Johnson, 2013). Especialmente em um país tropical como o Brasil, um país com clima quente e úmido em sua maior extensão o risco torna-se bastante acentuado.

Como uma medida de prevenção, o MAPA estabeleceu como valor máximo de atividade de água (a_w) para mortadela comercializada em temperatura ambiente, 0,955 (Brasil, 2015), com base em estudo realizado pelo ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos – Campinas/SP). Em embutidos cárneos o ajuste da a_w é realizado principalmente com adição de cloreto de sódio (NaCl) (Leistner, 2000). Porém, existe uma tendência atual por parte das indústrias processadoras de reduzir o teor de sódio nestas categorias de produtos (Brasil, 2013). Uma alternativa para redução de sódio nos alimentos é a substituição parcial de NaCl por cloreto de potássio (KCl). Todavia, o KCl contribui de forma menos efetiva para o aumento da força iônica quando comparado ao NaCl, caso não seja feito ajuste levando em conta a molaridade do KCl e portanto a força iônica. A força iônica está diretamente relacionada com a a_w (Ruusunen e Puolanne, 2005). Uma diminuição da força iônica levaria ao aumento da a_w , podendo interferir na estabilidade microbiológica de produtos cárneos. Uma alternativa, que somaria como coadjuvante na segurança microbiológica e permitiria o ajuste da a_w , seria o uso de sorbato de potássio, cujo efeito sobre a germinação de *Clostridium botulinum* (Sofos, 1980) e *C. perfringens* (Alnoman et al., 2015) foram evidenciados em inúmeros trabalhos científicos realizados

com produtos cárneos (Glass et al. 2007) demonstraram que o sorbato de potássio pode ter efeito antimicrobiano frente a *Listeria monocytogenes* inoculadas em fatias de mortadela Bologna.

O nitrito apresenta como uma de suas funções o efeito contra germinação e crescimento do *C. botulinum* em produtos cárneos (Rivera et al., 2019). Em contrapartida, inovações recentes em produtos cárneos buscam formulações com menos ingredientes sintéticos, como por exemplo, o nitrito, e/ou adicionando ingredientes benéficos (Shan et. al, 2017, Flores e Toldrá, 2021). Processos térmicos brandos, substituição dos agentes de cura tradicionais por alternativas naturais, redução de gordura e de sal destacam-se entre os trabalhos recentes (Alahakoon et al., 2015; Bakhtiary et al., 2018; Lee et al., 2018). Tais trabalhos têm priorizado aspectos sensoriais como cor, sabor, textura e aceitação (Yotsuyanagi et al., 2016; Szpicer et al., 2018) e alguns avaliam o crescimento de micro-organismos deteriorantes (Perea-Sanz et al., 2019; Marchetti et al., 2017).

Em relação à segurança microbiológica, os patógenos comumente avaliados são psicrotóxicos e a maior parte dos estudos inclui *Listeria monocytogenes* (Laranjo et al., 2019; Nieto-Lozano, 2006), que são de grande relevância nos produtos cárneos pasteurizados, pois a grande parte desses produtos são comercializados sob refrigeração. Porém, alguns produtos cárneos pasteurizados são comercializados em temperatura ambiente. Nesse tipo de produto, devido à ausência da barreira de refrigeração, se os outros parâmetros não forem suficientes, pode ocorrer germinação de esporos de *C. botulinum* proteolítico e outros patógenos, tais como *Staphylococcus aureus*. Para os produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente, as alterações da formulação ou processo podem fragilizar a segurança microbiológica frente a patógenos mesófilos. Assim, o U. S. Department of Agriculture – Food Safety and Inspection Service (USDA-FSIS) exige que os fabricantes de produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente e prontos para consumo tenham evidências validadas dos parâmetros críticos necessários para prevenir o crescimento pós-processamento de bactérias patogênicas (Tilkens et al., 2015).

Uma vez que a neurotoxina botulínica tem um efeito deletério à saúde dos consumidores, podendo levar ao óbito, o *C. botulinum* proteolítico necessita ser avaliado como um perigo nos processos de fabricação de mortadela comercializada em temperatura ambiente. Contudo, não há relatos na literatura científica sobre o efeito do sorbato de potássio ou da substituição de NaCl por KCl, em mortadela, no combate ao *C. botulinum* do Grupo I proteolítico e/ou *C. sporogenes*. Dessa forma, existe a necessidade de estudos que estabeleçam parâmetros de segurança, que sejam barreiras à germinação de esporos e o desenvolvimento de bactérias anaeróbias estritas como *C. botulinum* do Grupo I proteolítico em mortadelas comercializadas em temperatura ambiente.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade e segurança microbiológica em mortadela de baixo custo comercializada em temperatura ambiente, através de teste desafio com *Clostridium sporogenes* PA3679, utilizado como substituto do *C. botulinum* do Grupo I.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudar o efeito antimicrobiano do eritorbato de sódio (antioxidante) e sua interação com o nitrito residual, em diferentes atividades de água, através de teste desafio com *C. sporogenes* PA 3679, como “surrogate” do *C. botulinum* proteolítico.
2. Estudar o efeito antimicrobiano do sorbato de potássio em diferentes atividades de água, por meio de teste desafio com *C. sporogenes* PA 3679, como surrogate do *C. botulinum* proteolítico.
3. Estudar o impacto da substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio em diferentes atividades de água, por meio de teste desafio com *C. sporogenes* PA 3679, como “surrogate” do *C. botulinum* proteolítico.

REFERÊNCIAS

- Alahakoon, A. U., Jayasena, D. D., Ramachandra, S. & Jo, C. (2015). Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 37-49.
- Alnoman, M., Udombijitkul, P., Paredes-Sabja, D. & Sarker, M. R. (2015). The inhibitory effects of sorbate and benzoate against *Clostridium perfringens* type A isolates. *Food microbiology*, 48, 89-98.
- Bakhtiary, F., Sayevand, H. R., Khaneghah, A. M., Haslberger, A. G. & Hosseini, H. (2018). Antibacterial efficacy of essential oils and sodium nitrite in vacuum processed beef fillet. *Applied Food Biotechnology*, 5(1), 1-10.
- BRASIL. Instrução normativa n.º 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. 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 Saúde. Extrato de compromisso. *Diário oficial da União*, Brasília, n. 242, 13 de dezembro de 2013. *Diário oficial*, Seção 3, p. 160.
- Flores M. & Toldra F. (2021). Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products. *Meat Sci* 171:108272.
- Gill, C. O. & Jones, S. D. M. (1992). Evaluation of a commercial process for collection and cooling of beef offals by a temperature function integration technique. *International Journal of Food Microbiology*, v.15, p.131 – 143.
- Glass, K., Preston, D. & Veessenmeyer, J. (2007). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Turkey and Pork-Beef Bologna by Combinations of Sorbate, Benzoate, and Propionate. *Journal of Food Protection*, v.4, n.1, p. 241-217.

Johnson, E. A. (2013). *Clostridium botulinum*. In: Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, p.288–304.

Laranjo, M., Potes, M. E., Gomes, A., Véstia, J., Garcia, R., Fernandes, M. J. ... & Elias, M. (2019). Shelf-life extension and quality improvement of a Portuguese traditional ready-to-eat meat product with vinegar. *International Journal of Food Science & Technology*.

Lee, S., Lee, H., Kim, S., Lee, J., Ha, J., Choi, Y. & Yoon, Y. (2018). Microbiological safety of processed meat products formulated with low nitrite concentration—A review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 31(8), 1073-1077.

Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, v.55, p.181–186.

Marchetti, L., Andrés, S. C. & Califano, A. N. (2017). Physicochemical, Microbiological and Oxidative Changes During Refrigerated Storage of n-3 PUFA Enriched Cooked Meat Sausages with Partial NaCl Substitution. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12920.

Nieto-Lozano, J. C., Reguera-Useros, J. I., Peláez-Martínez, M. D. C., & de la Torre, A. H. (2006). Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. *Meat science*, 72(1), 57-61.

Perea-Sanz, L., Montero, R., Belloch, C., & Flores, M. (2019). Microbial changes and aroma profile of nitrate reduced dry sausages during vacuum storage. *Meat science*, 147, 100-107.

Rivera, N., Bunning, M., & Martin, J. (2019). Uncured-labeled meat products produced using plant-derived nitrates and nitrites: Chemistry, safety, and regulatory considerations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(29), 8074-8084.

RUUSUNEN, M. & PUOLANNE, E. Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, v.70, p. 531–541, 2005.

Shan, L. C., De Brún, A., Henschion, M., Li, C., Murrin, C., Wall, P. G., & Monahan, F. J. (2017). Consumer evaluations of processed meat products reformulated to be healthier—A conjoint analysis study. *Meat science*, 131, 82-89.

Sofos, J. N. & Busta, F. F. (1980). Alternatives to the use of nitrite as an antibotulinal agent. *Food Technology*.

Szpicer, A., Onopiuk, A., Póltorak, A. & Wierzbicka, A. (2018). Influence of oat β -glucan and canola oil addition on the physico-chemical properties of low-fat beef burgers. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(11), e13785.

Tilkens, B. L., King, A. M., Glass, K. A. & Sindelar, J. J. (2015). Validating the inhibition of *Staphylococcus aureus* in shelf stable, ready-to-eat snack sausages with varying combinations of pH and water activity. *Journal of food protection*, 78(6), 1215-1220.

Yotsuyanagi, S. E., Contreras-Castillo, C. J., Hagiwara, M. M., Cipolli, K. M., Lemos, A. L., Morgano, M. A. & Yamada, E. A. (2016). Technological, sensory and microbiological impacts of sodium reduction in frankfurters. *Meat science*, 115, 50-59

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Trabalho a ser enviado para "Current Opinion in Food Science"

1. *Clostridium botulinum*

O *C. botulinum* é um microrganismo anaeróbio estrito, Gram-positivo e formador de esporo (Johnson et al., 2007). Existem sete sorotipos (A-G) de *C. botulinum* que são classificados pelas diferenças imunológicas em relação à neurotoxina produzida pelo microrganismo, assim como, pela reação de cada cepa com o antissoro específico (Shukla e Sharma, 2005). Uma neurotoxina botulínica foi descrita baseada em características imunológicas de cultura distinta de *C. botulinum* e no sequenciamento do DNA, sendo proposto um oitavo sorotipo, denominado neurotoxina botulínica H (Barash e Arnon, 2014; Dover et al., 2013).

Dentro da espécie de *C. botulinum*, existem quatro Grupos fenotípicos distintos (I – IV) que são organizados em: Grupo I) cepas proteolíticas produtoras de uma ou mais neurotoxinas do tipo A, B ou F; Grupo II) cepas não proteolíticas e sintetizadoras de apenas um tipo de neurotoxina: B, E ou F; Grupo III) cepas que produzem neurotoxina do tipo C1 ou D; e o Grupo IV) cepas produtoras de neurotoxina G (Lindström et al. 2001).

Os clostrídios botulinogênicos são extremamente heterogêneos em sua fisiologia e, estas diferenças são observadas em muitas características, incluindo estabilidade ao aquecimento dos esporos, temperatura ótima de crescimento, tolerância a ácido e sal, atividade proteolítica e utilização de substrato (Johnson, 2013), como se observa nas Tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1. Grupos e propriedades relevantes de crescimento e resistência de clostrídios produtores de neurotoxinas*.

Propriedades	Grupo					
	<i>C. botulinum</i>			IV (<i>C. argentinense</i>)	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
	I	II	III			
Tipos de neurotoxina	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Temperatura de crescimento (C°)						
Mínimo	10	3	15	12	10	20
Ótimo	35-40	18-25	35-40	35-40	30-37	30-40
Máximo	48	45	NA	45	40	NA
pH mínimo	4,6	5,0	NA	NA	3,6	NA
A_w inibitório	0,94	0,97	NA	NA	0,97	NA
Concentração (%) de NaCl inibitório	10	5	3	>3	5	5
Valor D de esporos (min) a:						
100°C	25	<0,1	NA	NA	NA	NA
121°C	0,21	<0,005				

*Os dados são para um número limitado de cepas. Os fatores inibitórios interagem e, portanto, os valores inibitórios podem ser afetados por combinações subletais de fatores. *C. sporogenes*, frequentemente considerado um substituto para o grupo I *C. botulinum*, apresenta valores de D121°C variando de 0,5 a 6 min. NA (*not available*). Fonte: Johnson (2019).

Tabela 2. Substratos nutricionais metabolizados por clostrídios botulinogênicos.

Espécies e tipos (Grupo) de <i>Clostridium</i>	Glicose	Frutose	Sacarose	Maltose	Lactose	Gelatina	Leite	Carne	Lipase	Lectinase
<i>C. botulinum</i>										
Tipos A, B, F (I)	+	+/-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	-
Tipos B, E, F (II)	+	+	+/-	+/-	-	+	-	-	+	-
Tipos C, D (III)	+	+/-	+/-	+/-	-	+	+/-	-	+	-
<i>C. argentinense</i> (IV)	-	-	-	-	-	+	+	+/-	-	-
<i>C. baratii</i> , toxigênico	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	+
<i>C. butyricum</i> , toxigênico	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

*Símbolos: +, positivo; -, negativo; +/-, fraco ou variável. Fonte: Johnson (2019).

Tabela 3. Hospedeiros primários e localização de genes de toxinas nos sorotipos de *C. botulinum* A a G.

Sorotipos	Espécies susceptíveis	Localização gene neurotoxina
A	Humanos e cavalos	Cromossomo, plasmídeos grandes em algumas linhagens
B	Humanos, cavalos, suínos e primatas	Cromossomo, plasmídeos grandes em algumas linhagens
C	Aves, cavalos, gado, raposas, cães e tartarugas	Bacteriófago pseudolisogênico, plasmídeo
D	Gado	Bacteriófago pseudolisogênico, plasmídeo
E	Peixe e aves aquáticas	Cromossomo, plasmídeos grandes em algumas linhagens
F	Humanos (raro)	Cromossomo, plasmídeos grandes em algumas linhagens
G	Nenhum conhecimento	Plasmídeo grande

Fonte: Johnson (2019).

O *C. botulinum* é o agente etiológico do botulismo, uma grave enfermidade que apresenta três formas clássicas, que se diferenciam pela via de transmissão e/ou hospedeiro susceptível: por ferimento, infantil ou alimentar. O botulismo por ferimento é ocasionado pela contaminação de feridas profundas ou lacerações por esporos, que em condições de anaerobiose, assumem a forma vegetativa e produzem toxina *in vivo* (Maksymowych et al. 1999). O botulismo infantil acomete bebês de até um ano de idade, pela ingestão de alimentos contaminados por

esporos que germinam e produzem toxinas no intestino. Esta forma da doença está normalmente associada ao consumo de mel contaminado por esporos de *C. botulinum* (Cereser et al., 2008).

O botulismo alimentar resulta da ingestão de alimentos contendo neurotoxinas produzidas durante o crescimento do patógeno no produto (Davis, 2003). Os sintomas clássicos de botulismo alimentar incluem visão embaçada, pálpebras caídas, fala arrastada, dificuldade de engolir, boca seca, fraqueza e paralisia muscular progressiva, resultando em óbito por parada respiratória (Lindström et al., 2001). Geralmente, os sintomas iniciais aparecem com 18 a 36 horas após a ingestão de alimento contaminado. Contudo, o período de incubação pode variar de 6 horas a 10 dias (Shapiro et al., 1998). A duração da doença é influenciada pelo tipo de neurotoxina. O botulismo causado pelas neurotoxinas A e B apresenta quadro clínico com duração de 3 a 6 meses. Já os sintomas causados pelas neurotoxinas E e F tem duração de um dia a um mês, sendo passíveis de subnotificação (Pellett, 2015).

O botulismo apresenta o maior custo por hospitalização de pacientes dentre todas as doenças de origem alimentar (Roberts, 2000; Mead, 1999; Sofos et al, 1998). Uma dose letal para toxina tipo A em um homem de 70 kg é igual a 0,09-0,15 µg, por via intravenosa ou intramuscular, de 0,70-0,90 µg por inalação, ou ainda de 70 µg por via oral (Stephen, 2001). A toxicidade via oral depende do sorotipo da neurotoxina botulínica, do consumo do alimento contaminado, presença de alimento e álcool no trato intestinal, assim como outros fatores (Johnson, 2013). Essas toxinas perdem sua atividade quando submetidas à 80°C durante 30 minutos, 100°C por 5 minutos, ou a temperatura ambiente por 12 horas, além disso, quando expostas à luz solar por 1 a 3 horas ou em 20 minutos em água clorada de tratamento público (concentração não especificada, destruição de 84%) (Pinillos et al., 2003). A formação de neurotoxina não é necessária para o crescimento e sobrevivência do *C. botulinum* em laboratório, uma vez que a inativação ou exclusão dos genes da neurotoxina não altera o crescimento, embora pareça aumentar a esporulação (Johnson e Bradshaw, 2001; Bradshaw et al., 2010).

A importância do botulismo para a indústria alimentícia decorre da ampla distribuição de esporos de *C. botulinum* no ambiente, da alta resistência dos endosporos às tecnologias de processamento de alimentos e da capacidade do *C. botulinum* de crescer e formar neurotoxinas em alimentos (Johnson, 2013; Bell, 2000). Os principais fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o crescimento de *C. botulinum* em alimentos (Tabela 4) são temperatura, pH, a_w , potencial redox, concentração de nutrientes, presença de antimicrobianos e microbiota competitiva (ICMSF, 1996).

Muitos alimentos são formulados para serem sensorialmente desejáveis através de combinações de fatores inibidores em níveis subletais, e geralmente recebem processamento térmico mínimo ou tratamento de alta pressão (Johnson, 2019). Um exemplo de alimento de baixa acidez, preparado de maneira segura para evitar o desenvolvimento de *Clostridium botulinum* e produção de neurotoxina, usando uma combinação de tratamentos e antimicrobianos é a carne curada, na qual o processamento de calor mínimo é combinado com a adição de nitrito (Hauschild, 1989).

Tabela 4. Tratamentos físicos primários e fatores intrínsecos utilizados na formulação de alimentos seguros para o botulismo.

Tratamentos físicos primários	Tratamento térmico
	pH
	A_w
	Presença de antimicrobianos e microbiotas competitivas
	Ácidos orgânicos
	Nitritos, sulfitos, compostos fenólicos
Fatores intrínsecos	Polifosfatos
	Ácidos graxos e ésteres
	Composição gasosa
	Ocorrência natural de antimicrobianos
	Microbiotas competitivas
	Antimicrobianos indiretos

Fonte: Johnson (2019).

Desta forma, o processo de “*botulinum cook*” foi desenvolvido para reduzir a população de esporos mais resistentes de *C. botulinum* para 10^{-12} da contagem inicial em alimentos enlatados de baixa acidez (Austin, 2014). O tratamento térmico a $121,1^{\circ}\text{C}$ por 3 min (ou um tratamento térmico de letalidade equivalente à outra temperatura) reduz o número de esporos de *C. botulinum* proteolítico em 10^{12} (um processo de 12D) (Peck e Stringer, 2005). Desta forma, o tratamento térmico aplicado para produtos cárneos pasteurizados, como mortadela e salsicha, é insuficiente para inativar os esporos de *C. botulinum* do Grupo I (proteolíticos), sendo necessário o emprego de barreiras adicionais.

Os esporos de *C. botulinum* isolados do trato intestinal de peixes, aves, mamíferos (mas não de humanos) e certos invertebrados saudáveis, são frequentemente associados com a decomposição de plantas e animais, nos quais o ambiente anaeróbio, rico em nutrientes, promove a formação de esporos (Johnson, 2019). Os esporos são distribuídos na natureza através de fômites, vetores e por processos ambientais naturais (vento, chuva e escoamento), bioturbação, práticas agrícolas, gerenciamento de bacias hidrográficas e outras rotas (Espelund e Klaveness, 2014; Long e Tauscher, 2006).

Os endósporos de *C. botulinum* são compostos por núcleo, região do córtex e camadas de revestimento. O revestimento do esporo é uma estrutura complexa de muitas camadas (Setlow, 2006) e composta de polipeptídeos com fortes ligações cruzadas (Mah et al., 2008). Esta estrutura apresenta alta resistência térmica, além de resistência à luz ultravioleta, ambientes ácidos, dessecação, alta pressão e condições de aerobiose (Pellett, 2015). Segundo Johnson (2013), os esporos de *C. botulinum* apresentam valor de $D_{121^{\circ}\text{C}}$ de 0,21 minutos.

2. Surtos de botulismo relacionados a produtos cárneos

O botulismo de origem alimentar ocorre em todo o mundo por meio do consumo de uma variedade de alimentos, mas a ocorrência e o tipo de produto vinculado variam dependendo da região geográfica, país e práticas de processamento e manuseio de alimentos (Johnson, 2019). O primeiro surto reportado na literatura sobre botulismo ocorreu em 1793 na Alemanha, devido ao consumo de “*Blunsen*”, um tipo de salsicha fervida e defumada e resultou em

30 casos e seis óbitos (Schocken-Iturrino et al., 1999). Em 1897, na Bélgica, investigando um surto de 24 casos, relacionado ao consumo de presunto, Emile Van Ermangem isolou pela primeira vez o microrganismo *C. botulinum* e detectou sua toxina (Ketcham e Gomez, 2003).

Na França, entre 1993 e 1996, 70 casos foram identificados, todos envolvendo a neurotoxina tipo B. O alimento de maior impacto para a saúde humana foi o presunto (48%), porém, carne de porco cozida, vegetais enlatados e moluscos (mariscos) também foram relacionados como veiculadores do botulismo (Leclerc et al., 2002). Na Polônia, um total de 72 casos de botulismo foi registrado em 2000, os derivados cárneos foram os principais veículos da toxina botulínica (56,9%) (Przybylska, 2002). Ouagari et al. (2002) reportaram um estudo epidemiológico e descritivo de onze pacientes com suspeita de botulismo no Marrocos, as investigações permitiram identificar a ingestão de mortadela como responsável pela intoxicação. Em 2008, foram identificados dois casos na França, nos quais o alimento veiculador foi uma enchilada de frango que tinha sido submetida à temperatura de abuso (Parkison et al, 2017).

Em Santa Catarina, no ano de 2011, foi notificado um surto envolvendo sete pessoas, devido ao consumo de mortadela produzida no Rio Grande do Sul (Secretaria de Estado de Saúde de Santa Catarina, 2011).

De acordo com Pellett (2015) nos Estados Unidos são registrados aproximadamente 150 casos de botulismo por ano. O botulismo é considerado uma emergência de saúde pública nos Estados Unidos e em muitos países do mundo, e sua ocorrência desencadeiam intensas respostas regulatórias e médicas (Johnson, 2017; Thirunavukkarasu et al, 2018; Yu et al, 2018).

3. Utilização de *C. sporogenes* como substituto do *C. botulinum* do Grupo I proteolítico

Muitos estudos já foram realizados com *C. botulinum* para validação de processos térmicos em alimentos de baixa acidez e comercializados em temperatura ambiente (Brown et al., 2012). Porém, devido ao alto risco de

segurança microbiológica, atualmente não se recomenda mais este tipo de estudo (Brown et al., 2012).

A cepa de *C. sporogenes* PA3679 foi primeiramente isolada por E. J. Cameron em 1927, de conserva de milho deteriorada (Townsend et al., 1938). Este microrganismo foi apontado como um substituto para o *C. botulinum* proteolítico em estudos com inoculação artificial, uma vez que seus esporos apresentam resistência térmica maior que os esporos de *C. botulinum* (Townsend et al., 1938). Lee e Riemann (1970) demonstraram que o DNA do PA3679 é homólogo ao DNA do *C. botulinum* A62 e que, portanto, as duas cepas estariam intimamente relacionadas. Existem apenas dois aspectos que os diferem: produzir esporos com maior resistência térmica e não possuir os genes de produção da neurotoxina (Nakamura et al, 1977; Bull et al, 2009; Brown et al, 2012; Diao e Membré, 2014).

Desde então, a cepa de *C. sporogenes* PA 3679 tem sido largamente utilizada como um modelo de organismo não toxigênico para o *C. botulinum* proteolítico do Grupo I, com a finalidade de validar processos térmicos para alimentos enlatados de baixa acidez (Jaam et al., 2016). O tempo de redução decimal (D) a 121,1°C para *C. botulinum* (tipos A e B) e *C. sporogenes* é de 0,1 a 0,2 e de 0,1 a 1,5 min, respectivamente (Silva et al., 2010). Devido à sua maior resistência ao calor, fornece uma margem de segurança conservadora nos estudos de processamento térmico e outros testes desafio de alimentos (Johnson, 2019).

C. sporogenes PA 3679 tem sido utilizado também como substituto do *C. botulinum* proteolítico em estudos para avaliar a segurança microbiológica em relação à germinação de esporos e crescimento de células vegetativas [Diao et al. (2014), Brown et al. (2012), Bradbury et al. (2012), Khanipour et al. (2016), Taylor et al. (2013)]. Bradbury et al. (2012) sugerem que a separação filogenética de *C. botulinum* e *C. sporogenes* não é sustentável, dada a correspondência > 85% de *C. sporogenes* PA 3679 com cepas proteolíticas de *C. botulinum*. Com relação a produtos cárneos, Pinelli et al. (2021) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e suas nanoemulsões contra o *C.*

sporogenes inoculado em mortadela com 75 ppm de nitrito de sódio. Os resultados demonstraram que as nanoemulsões foram mais efetivas que os óleos essenciais em reduzir as células vegetativas de *C. sporogenes*. Silva et al. (2021) avaliaram o efeito da radiação gamma (0, 1,5, 3, 4,5 e 6 KGy) e nitrito de sódio (0, 50 e 150 mg/kg) sobre esporos de *C. sporogenes* em presunto cozido, os resultados demonstraram que o número de esporos reduziu com o aumento das doses de radiação. Bhusal et al (2021) avaliaram o uso de nitrito de fonte natural (aipo) para prevenir a germinação de esporos de *C. sporogenes* como substituto do *C. botulinum* em produtos cárneos cozidos, os resultados demonstraram que o nitrito (de aipo ou sódio) pode prevenir a germinação de *C. sporogenes*. Boix et al (2021) concluíram que a interação sinérgica entre os fatores ambientais (pH e NaCl) e o estado fisiológico (células vegetativas e esporos) abrem novas possibilidades para otimizar os processos de formulação de alimentos para gerenciar os riscos de crescimento de *C. sporogenes* PA 3679.

4. Mortadela de baixo custo comercializada em temperatura ambiente

O MAPA através do Ofício Circular nº 005/2015/CGI/DIPOA/DAS (BRASIL, 2015) autorizou a continuidade da produção de mortadela comercializada em temperatura ambiente, desde que as indústrias cumpram os seguintes requisitos: a) o produto possua atividade de água (a_w) 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 de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (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.

O produto mortadela de baixo custo comercializado em temperatura ambiente é responsável pela maior parte da produção, em volume, dentro da categoria mortadela no Brasil. Os fabricantes deste produto se adequaram aos requisitos citados acima, pois caso contrário, o produto deve ser comercializado

refrigerado (Brasil, 2015), reduzindo de forma significativa os lucros com a comercialização do produto ao longo da cadeia de distribuição.

A matéria prima cárnea usada em maior quantidade neste produto é a carne mecanicamente separada de aves. A CMS geralmente apresenta alta carga de microrganismos (EFSA, 2013). Muitos aspectos de processamento da CMS podem favorecer o crescimento microbiano como grande área de superfície, liberação de fluidos ricos em nutrientes das células devida à maceração, calor gerado durante a separação mecânica, intensa manipulação, contaminação cruzada (Viuda-Martos et al., 2012).

Apesar dos requisitos estabelecidos pelo MAPA (Brasil, 2015) para diminuir os riscos de transmissão de botulismo, através da ingestão de mortadela comercializada em temperatura ambiente, algumas características deste produto são favoráveis ao crescimento de *C. botulinum*. O pH no produto se encontra na faixa de 6,2-6,4 por requisitos tecnológicos (por exemplo, ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares) e presença de aditivos como, por exemplo, os fosfatos que aumentam o valor do pH no produto. Segundo Johnson (2013) o pH mínimo para crescimento do *C. botulinum* é 4,6. A a_w encontra-se em faixa limítrofe para o desenvolvimento de *C. botulinum* do Grupo I, entre 0,95 e 0,97 (Johnson, 2013).

Segundo Johnson (2013), concentrações de cloreto de sódio (NaCl) maiores que 10% e 5% inibiriam o crescimento de *C. botulinum* do Grupo I e II, respectivamente. Porém, a mortadela de baixo custo apresenta níveis de no máximo 4% de NaCl. Soma-se a estes fatores intrínsecos, o ambiente anaeróbio, ou seja, com potencial redox baixo, criado pelo envoltório plástico impermeável, o que favorece a germinação de esporos, crescimento e produção de neurotoxinas pelo *C. botulinum*.

Como fator extrínseco favorável ao crescimento de *C. botulinum*, a temperatura de estocagem recomendada pelos fabricantes para a mortadela comercializada em temperatura ambiente é aproximadamente de 22°C a 27°C (dados de embalagens). A temperatura para crescimento de *C. botulinum* do tipo I é de no mínimo de 10°C e ótima de 37°C (Johnson, 2013).

Com relação ao tratamento térmico do produto, este se caracteriza como uma pasteurização. O processo de cozimento da mortadela comercializada em temperatura ambiente precisa assegurar a redução de seis ciclos logarítmicos (6D) do *Streptococcus D* (Brasil, 2015). Segundo Foulque Moreno et al. (2006), o *Streptococcus D* atualmente é classificado como *Enterococcus faecium*. Este micro-organismo apresenta valor $D_{63^{\circ}\text{C}}$ de 3,6 a 49 minutos, dependendo da cepa (McAuley et al, 2012).

5. Efeito da temperatura de estocagem sobre o *C. botulinum*

A refrigeração ou congelamento são usados como uma barreira em produtos cárneos. Porém, em produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente, essa barreira pode ser insuficiente (temperatura ambiente) ou ausente (temperatura de abuso). Neste sentido, um estudo inoculou uma mistura de esporos com diferentes cepas de *C. botulinum* proteolítico em pasta de carne preparada sob N_2 e aquecida a 95°C por 23 min, resfriada e incubada sob refrigeração ou abuso de temperatura. O crescimento e produção de toxinas não ocorreram a 8°C , a 12°C observou-se um crescimento e produção de toxina após 21 dias, a 16°C após 4-7 dias e a 25°C após 2 dias (Peck e Stringer, 2005). Os resultados do estudo indicaram que a temperatura de estocagem exerce influência significativa no crescimento do patógeno. Esse estudo corrobora com outros que reportaram que a refrigeração $\leq 10^{\circ}\text{C}$ é eficiente no controle de *C. botulinum* do Grupo I (Peck, 2009).

Um estudo investigou o efeito de temperatura no crescimento e sobrevivência de *Staphylococcus aureus* e a possibilidade de produção de enterotoxina A em *jerked beef* com a_w de 0,78 (Kim et al., 2018). As amostras sem condimentos foram inoculadas na concentração de 3-4 log UFC/g e armazenadas na faixa de 10 a 35°C . O crescimento e sobrevivência do *S. aureus* foi observada em temperaturas acima de 21°C e abaixo de 19°C , respectivamente. A densidade máxima de população foi observada a 25°C , mas sem produção de enterotoxina A. Apesar da baixa a_w do *jerked beef* o crescimento do *S. aureus* foi observado acima de 21°C , indicando que barreiras

adicionais devem ser consideradas para reduzir os riscos. Portanto, segundo os autores, a temperatura de distribuição e comercialização deve ser reavaliada para garantir a segurança do produto.

O abuso de temperatura é uma das causas mais comuns que resultam em produção de neurotoxina e surtos de botulismo. Portanto, não é recomendável utilizar apenas a cadeia de frio como parâmetro para segurança frente ao botulismo, sendo necessária a inclusão de barreiras secundárias, como o uso de antimicrobianos (Johnson, 2019). Ademais, ressalta-se a importância do cuidado com produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente, nos quais a temperatura de estocagem não representa uma barreira eficiente contra o *C. botulinum* e outros patógenos. Observa-se que alterações na formulação ou processo destes produtos devem ser avaliadas para que a segurança microbiológica destes permaneça garantida.

6. Substituição parcial de NaCl por KCl em produtos cárneos

Apesar de o sódio ser vital para a saúde, quando ingerido em excesso tem sido relacionado a problemas de saúde, como a hipertensão (Stringer e Pin, 2005). No Brasil, o consumo de sal excede as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) de cinco gramas de sal por dia. Um estudo baseado nos dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) realizado pela ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação) referentes aos anos de 2008 e 2009 revelou, que a região Nordeste apresentou o maior consumo de sal (13,8 gramas per capita) e a região Sudeste teve o menor consumo de sal por habitante (9,7 gramas) (ABIA, 2013). A meta para o teor de sódio para 2017 segundo o Ministério da Saúde era de que a mortadela comercializada em temperatura ambiente contesse 1350mg/100g de produto (Brasil, 2013).

A atividade antimicrobiana do sal está relacionada à redução da atividade de água do produto, resultando em desidratação osmótica das células bacterianas, causando a saída de água através das membranas semipermeáveis (Stringer e Pin, 2005). Um exemplo da importância da a_w é demonstrada através de publicações do USDA-FSIS, os quais sugerem que a a_w

provavelmente é o fator intrínseco mais importante no controle de patógenos em salsichas semi-desidratadas (USDA, 2005).

Além da a_w , o ânion cloreto tem a função principal na atividade antimicrobiana do cloreto de sódio por duas razões. Primeiro pela formação de cloreto de nitrosilo (NOCl) que é um forte agente de nitrosilação, o que aumenta o estresse oxidativo (Devine e Dikeman, 2014). Segundo pela aceleração do efeito cinético da catalização ácida da oximioglobina, que promove a formação de peroxinitrito (Andersen, Bertelsen e Skibsted, 1988).

Há alguns anos as autoridades de saúde pública de vários países orientaram as indústrias de alimentos a reduzir o teor de sal (sódio) nos produtos. Porém, para reduzir os níveis de sal são necessários ajustes das propriedades intrínsecas e/ou extrínsecas dos alimentos. Garantindo, assim, que o mesmo grau de segurança seja mantido (Stringer e Pin, 2005). Caso contrário, a redução de sódio pode comprometer a segurança microbiológica, permitindo o crescimento de patógenos como a *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* (proteolítico e não proteolítico), *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas hydrophila*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* (IOM, 2010).

Uma das principais alternativas para a redução de sódio é a substituição parcial NaCl por KCl. Este sal possui propriedades similares ao NaCl e é reconhecido como seguro (GRAS), podendo ser usado na sua substituição sem perda da funcionalidade (Collins, 1997). O cloreto de potássio é provavelmente o sal mais comumente utilizado como substituto em alimentos com teores reduzidos de sódio. Bidlas e Lambert (2008) demonstraram que o cloreto de potássio possui efeito antimicrobiano equivalente ao NaCl (calculado em base molar) sobre *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter sakazakii*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* e três cepas de *Staphylococcus aureus*.

7. Ação antimicrobiana do nitrito e antioxidantes em produtos cárneos

A contribuição do nitrito e do sal na inibição de crescimento de *C. botulinum* é conhecida em produtos cárneos curados durante muito tempo, mas também é

estabelecido que muitos outros fatores são importantes (Stringer e Pin, 2005). Dentre estes fatores, incluem-se o pH do produto, severidade do processamento térmico, presença de outros aditivos e/ou conservantes (nitrato, polifosfato, isoascorbato/ascorbato e sorbato) e o efeito do ambiente, como por exemplo, a temperatura de estocagem (Roberts e Gibson, 1986).

O nitrito contribui para o estresse oxidativo por ser o precursor do íon peroxinitrito (ONOO⁻), que é um forte oxidante. Desta forma, o estresse bacteriano ocorre pelo sistema nitrato-nitrito-peroxinitrito que é dependente do pH e da baixa pressão parcial de oxigênio (Majou e Christieans, 2018). O íon peroxinitrito age predominantemente como um agente que promove modificações das bases do DNA (Jourdeuil, Kang, & Grisham, 1997; Kamat, 2006). Além do mais, o óxido nítrico se liga ao ferro, deste modo, limita a disponibilidade do ferro necessária para as funções das enzimas e para o metabolismo das bactérias (Tompkin, 2005). Isso ocorre devido à interação do óxido nítrico derivado do nitrito com as proteínas clostridiais ferro-enxofre, resultando em uma rápida diminuição do ATP intracelular e do acúmulo de piruvato (Tompkin, 2005; Woods e Wood, 1982).

Cui et al. (2010) sugeriram que uma redução significativa nas concentrações de nitrito pode conduzir para um aumento do risco de intoxicação causada pelo *C. botulinum*. Gunvig et al (2013) desenvolveu um modelo para prever a interface entre crescimento e não crescimento de *C. botulinum* em produtos cárneos contendo vários níveis de nitrito de sódio (0 a 150 mg/kg), lactato de sódio (0 a 3%) e cloreto de sódio (1,2% a 2,4%) com diferentes pH (5,4 a 6,4) a 4 e 12°C. Não houve crescimento de *C. botulinum* em concentrações de 72 a 150 ppm de nitrito, independente do pH, níveis de cloreto de sódio e de lactato de sódio ou temperatura. Mas verificou-se o desenvolvimento do patógeno em níveis menores que 60 ppm de nitrito.

No caso de salames, fatores como o pH, a_w e microbiota competitiva podem exercer um efeito mais relevante que o nitrito na inibição do crescimento e da produção de toxinas pelo *C. botulinum*. Hospital et al. (2016) realizaram um teste desafio com duas variedades de salames (*salchichón* e *fuet*) inoculadas com esporos de *C. botulinum* do Grupo I (proteolíticos) e do Grupo II (não

proteolíticos). As amostras foram preparadas com 150 mg/kg de nitrato de sódio (NaNO_3) e 150 mg/kg de nitrito de sódio (NaNO_2), com 25% e 50% de redução da concentração de nitrito e nitrato, além de um tratamento sem adição dos compostos. O pH das amostras estabilizou em 5,0 no *salchichón* e 5,2 no *fuet*. A contagem de bactérias lácticas atingiu 8-9 log UFC/g após a fermentação. A a_w inicial (0,96) foi reduzida para 0,88-0,90 no final da maturação. Os autores não detectaram a neurotoxina botulínica em nenhuma das amostras após o processo de maturação (8 dias para o *fuet* e 10-12 para o *salchicón*), incluindo as amostras elaboradas sem nitrato e nitrito. Segundo os autores, embora a redução ou mesmo a remoção do nitrato/nitrito da formulação não tenha promovido o desenvolvimento do *C. botulinum*, seu papel antimicrobiano não deve ser subestimado. Em vista disto, ressalta-se a importância de conhecer o efeito do nitrito em produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente com alterações na formulação ou processo que diminuem o efeito de outras barreiras.

Porém, é consenso que o nitrito de sódio em produtos cárneos pode formar N-nitrosaminas carcinogênicas e outros produtos nitrosados (EFSA, 2005). Devido a estas evidências, os Estados Unidos e Europa vêm tentando encontrar alternativas para o uso de nitrito e nitrato de sódio (EFSA, 2005). Como resultado, encontraram atividade anti-clostridial no sorbato de potássio, certos polifosfatos, parabenos, antioxidantes, nisina e lactato de sódio quando usado em combinação com outros fatores (EFSA, 2005). Desta forma, o controle de *C. botulinum* e a formação de neurotoxinas em alimentos são um desafio contínuo, particularmente com as crescentes demandas dos consumidores por produtos com processamento mínimo e sem adição de conservantes (Johnson, 2019).

Os ascorbatos são usados com a função de acelerar o desenvolvimento e estabilidade da cura dos pigmentos da carne, mas eles também têm um efeito antioxidante (Stringer e Pin, 2005). Embora o ascorbato seja adicionado principalmente com estes propósitos, ele também pode contribuir para estabilidade microbiológica (Stringer e Pin, 2005). Segundo Tompkin (2005), a adição de 200 mg/kg de isoascorbato melhorou o efeito antibotulínico do nitrito no estudo de vida útil de carne curada enlatada.

8. Sorbato: ação antimicrobiana em produtos cárneos.

A a_w estabelecida em mortadela comercializada em temperatura ambiente é de 0,955 (Brasil, 2015). Para obter este valor de a_w é necessária uma adição de aproximadamente 3,5% de NaCl em mortadela (Sidone et al, 2016). Representando um valor alto frente às propostas de redução dos teores de sódio dos alimentos industrializados (Brasil, 2013). Uma alternativa seria o uso de aditivos como, por exemplo, o sorbato, como obstáculo ao crescimento de microrganismos, possibilitando a elaboração de produtos com a_w maior que 0,95 e conseqüentemente com menores teores de sódio.

O sorbato é um aditivo não autorizado para adição em produtos cárneos no país (Brasil, 2006), mas classificado como seguro pelo FDA (2005). A ingestão diária aceitável para seres humanos é de até 25 mg/kg do peso corpóreo, segundo o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (WHO, 1997). Nos países que autorizam o uso do sorbato, este é adicionado de 0,02 a 0,3% nos alimentos (Stopforth et al., 2005). Glass et al. (2007) demonstrou que o sorbato de potássio pode ter efeito antimicrobiano frente a *Listeria monocytogenes* inoculadas em fatias de Bologna. Al-Shuibi e Al-Abdullah (2002) estudaram o efeito da substituição de nitrito por sorbato em mortadela relacionado às características físico-químicas e sensoriais, mas não microbiológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. Cenário do consumo de sódio no Brasil. 2013. Disponível em: www.abia.org.br/sodio/Sodio.pdf. Acesso em: 12 de novembro de 2014.

Al-Shuib, A. M.; Al-Abdullah. (2002). Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of mortadella. *Meat Science*, v.62 , p.473–478.

Andersen, H. J., Bertelsen, G., & Skibsted, L. H. (1988). Salt effect on acid-catalyzed autoxidation of oxymyoglobin. *Acta Chemica Scandinavica*, 42(226), 226–236.

Austin, J. W. (2014). Microbiological safety of meat - *Clostridium botulinum* and Botulism. In: *Encyclopedia of Meat Sciences*, Eds.: Dikeman, M., Devine, C., Second Edition, p. 330-334.

Barash, J. R., & Arnon, S. S. (2014). A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins. *The Journal of infectious diseases*, 209(2), 183-191.

Bell, C. & Kyriades, A. (2000). *Clostridium botulinum*. A Practical Approach to Its Control in Foods. Blackwell Science Ltd, Oxford, United Kingdom.

Bhusal, A., Nelson, J., Pletcher, D., & Muriana, P. M. (2021). Comparison of Sodium Nitrite and ‘Natural’ Nitrite on the Inhibition of Spore Germination and Outgrowth of *Clostridium sporogenes* in Low-and High-Fat Frankfurters. *Applied Microbiology*, 1(1), 104-122.

Bidlas, E. & Lambert, R. J. W. (2008). Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *International Journal of Food Microbiology*, v.124, p.98–102.

Boix, E., Couvert, O., André, S., & Coroller, L. (2021). The synergic interaction between environmental factors (pH and NaCl) and the physiological state (vegetative cells and spores) provides new possibilities for optimizing processes to manage risk of *C. sporogenes* spoilage. *Food Microbiology*, 103832.

Bradbury, M., Greenfield, P., Midgley, D., Li, D., Tran-Dinh, N., Vriesekoop, F., & Brown, J. L. (2012). Draft genome sequence of *Clostridium sporogenes* PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic *Clostridium botulinum*.

Bradshaw, M., Marshall, K. M., Heap, J. T., Tepp, W. H., Minton, N. P. & Johnson, E. A. (2010). Construction of a nontoxigenic *Clostridium botulinum* strain for food challenge studies. *Applied and environmental microbiology*, 76:387–393.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº51, de 29 de dezembro de 2006. Regulamento Técnico de Atribuição de Aditivos, e seus Limites das seguintes Categorias de Alimentos 8: Carne e Produtos Cárneos, 2006.

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 Saúde. Extrato de compromisso. Diário oficial da União, Brasília, n. 242, 13 de dezembro de 2013. Diário oficial, Seção 3, p. 160.

Brown, J. L., Tran-Dinh, N. & Chapman, B. (2012). *Clostridium sporogenes* PA 3679 and Its Uses in the Derivation of Thermal Processing Schedules for Low-Acid shelf stable Foods and as a Research Model for Proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection*, v. 75, n. 4, p. 779–792.

Bull, M. K., Olivier, S. A., van Diepenbeek, R. J., Kormelink, F. & Chapman, B. (2009). Synergistic inactivation of spores of proteolytic *Clostridium botulinum* strains by high pressure and heat is strain and product dependent. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 434–445.

Cereser, N. D., Costa, F. M. R., Júnior, O. D. R., Silva, D. A. R. & Sperotto, V. R. (2008). Botulismo de origem alimentar. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.1, p.280-287.

Collins, J. E. (1997). Reducing salt (sodium) levels in process meat poultry and fish products. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. (Ed.) *Advances in meat research: production and processing of healthy meat, poultry and fish products*. London: Blackie Academic & Professional. p. 283-297.

Cui H., Gabriel A. A., & Nakano H. (2010). Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. *Food Control*, 21:1030-6.

Davis, L.E. (2003). Botulism. *Current Treatment Options in Neurology*, v. 5, p. 23–31, 2003.

Devine, C. & Dikeman, M. (2014). *Encyclopedia of meat sciences* (Second edition). Elsevier ISBN: 978-0-123-84731-7.

Diao, M. M., André, S. & Membré, J. M. (2014). Meta-analysis of D values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *International journal of food microbiology*, 174, 23–30.

Dover, N., Barash, J. R., Hill, K. K., Xie, G. & Arnon, S. S. (2013). Molecular characterization of a novel botulinum neurotoxin type H gene. *The Journal of infectious diseases*, v.209, p.192–202.

EFSA. (2005). Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Clostridium* spp in foodstuffs. *The EFSA Journal*, v.199, p.1-65.

EFSA. (2013). Scientific Opinion on the public health risks related to mechanically separated meat (MSM) derived from poultry and swine. *The EFSA Journal*, v. 11, n.3, p.1-78.

Espelund, M. & Klaveness, D. (2014). Botulism outbreaks in Natural environments— an update. *Frontiers in microbiology*, 5:287.

FDA. (2005). Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. FDA List of Food Additives that Generally Recognized as Safe (GRAS), US GPO:Washington, DC.

Foulque Moreno, M. R.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E. & Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal Food Microbiology*, v.106, p.1–24.

Glass, K., Preston, D. & Veessenmeyer, J. (2007). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Turkey and Pork-Beef Bologna by Combinations of Sorbate, Benzoate, and Propionate. *Journal of Food Protection*, v.4, n.1, p. 241-217.

- Gunvig A., Hansen F. & Borggard C. (2013). A mathematical model for predicting growth/no-growth of psychrotrophic *C. botulinum* in meat products with five variables. *Food Control*, 29: 309-17.
- Hauschild, A. H. W. (1989). *Clostridium botulinum*, p 111–189. In Doyle MP (ed), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, NY.
- Hospital, X. F., Hierro, E., Stringer, S., & Fernández, M. (2016). A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International journal of food microbiology*, 218, 66-70.
- ICMSF. (1996). *International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional, London, England.
- IOM. (2010). Preservation and physical property roles of sodium in foods. In: *Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States*, pp. 91–118. National Academies Press, Washington, DC.
- Jaam, O. E., Fliss, I. & Aider, M. (2016). Application of electro-activated potassium acetate and potassium citrate solutions combined with moderate heat treatment on the inactivation of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.33, p.483–488.
- Johnson, E. A. (2013). *Clostridium botulinum*. In: Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, p.288–304.
- Johnson, E. A. & Bradshaw, M. (2001). *Clostridium botulinum* and its neurotoxins: a metabolic and cellular perspective. *Toxicon* 39:1703–1722.
- Johnson, E. A.; San, P. & Finegold, S. M. (2007). *Clostridium*, p. 889-910. In: Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L. & Pfaller, M. A. (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Johnson E. (2017). *Clostridium botulinum* and the most poisonous poison, p 553–601. In Gurtler J, Doyle M, Kornacki J (ed), *Foodborne Pathogens. Virulence Factors and Host Susceptibility*. Springer International Publishing AG, Zurich, Switzerland.

- Johnson, E. A. (2019). *Clostridium botulinum*. Food microbiology: Fundamentals and frontiers, 487-512.
- Jourd'heuil, D., Kang, D. & Grisham, M. B. (1997). Interactions between superoxide and nitric oxide: Implications in DNA damage and mutagenesis. *Frontiers in Bioscience*, 2, d189–d196.
- Kamat, J. P. (2006). Peroxynitrite: A potent oxidizing and nitrating agent. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44(6), 436–447.
- Ketcham, E.M. & Gomez, H.F. (2003). Infant botulism: a diagnostic and management challenge pediatric perspective. *Air Medical Journal*, v.22, n.5, p.6-11.
- Khanipour, E., Flint, S. H., McCarthy, O. J., Golding, M., Palmer, J., Ratkowsky, D. A., ... & Tamplin, M. (2016). Modelling the combined effects of salt, sorbic acid and nisin on the probability of growth of *Clostridium sporogenes* in a controlled environment (nutrient broth). *Food Control*, 62, 32-43.
- Kim, Y. H., Nam, G. W., & Yoon, K. S. (2018). Growth and survival of *Staphylococcus aureus* on beef jerky as a function of temperature. *Journal of Food Safety*, 38(5), e12495.
- Leclerc, V. et al. (2002). Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. *Livestock Production Science*, Amsterdam, v.76, p.195-202.
- Lee, W. H., & Riemann, H. (1970). The genetic relatedness of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. *Microbiology*, 64(1), 85-90.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, v.55, p.181–186.
- Lindström, M.; Keto, R., Markkula, A., Nevas, M., Hielm, S. & Korkeala, H. (2001). Multiplex PCR Assay for Detection and Identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in Food and Fecal Material. *Applied Environmental Microbiology*, v.67, p.5694–5699.

Long, S. C. & Tauscher T. (2006). Watershed issues associated with *Clostridium botulinum*: a literature review. *Journal of water and health*, 4:277–288.

Mah, J.H., Kang, D.H. & Tang, J. (2008). Morphological study of heat-sensitive and heat-resistant spores of *Clostridium sporogenes*, using transmission electron microscopy. *Journal of Food Protection*, v.71, n.0, p.953–958.

Majou, D. & Christieans, S. (2018). Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat science*, 145, 273-284.

Maksymowych, A.B., Reinhard, M., Malizio, C.J., Goodnough, M.C., Johnson, E.A. & Simpson, L.L. (1999). Pure botulinum neurotoxin is absorbed from the stomach and small intestine and produces peripheral neuromuscular blockade. *Infection Immunity*, v. 67, p.4708–4712.

Mcauley, C. M., Gobius, K. S., Britz, M. L. & Craven, H. H. (2012). Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 154, n. 3, p. 162–168.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro. C., Griffin, P. M. & Tauxe, R. V. (1999). Food-related illness and death in the United States. *Emerging infectious diseases*, 5:607– 625.

NAKAMURA, S., OKADO, I., NAKASHIO, S., & NISHIDA, S. (1977). *Clostridium sporogenes* isolates and their relationship to *C. botulinum* based on deoxyribonucleic acid reassociation. *Microbiology*, 100(2), 395-401.

Ouagari, Z. et al. (2002). Le botulisme à Casablanca. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, Paris, v.95, n.4, p.272- 275.

Parkinson, N.G., Johnson, E.A., Ito, K. (2017). Botulism, p 381–393. In Dodd CER, Aldsworth T, Stein RA, Cliver DO, Riemann HP (ed), *Foodborne Diseases*, 3rd ed. Elsevier, Academic Press, London, United Kingdom.

Peck, M. W. (2009). Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Advances in microbial physiology*. 55:183–265, 320.

Peck, M. W., & Stringer, S. C. (2005). The safety of pasteurised in-pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. *Meat Science*, 70(3), 461-475.

Pellett, S. (2015). Pathogenesis of *Clostridium botulinum* in Humans, in *Human Emerging and Re-emerging Infections: Viral and Parasitic Infections*, Volume I (ed S. K. Singh), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

Pinelli, J. J., de Abreu Martins, H. H., Guimarães, A. S., Isidoro, S. R., Gonçalves, M. C., de Moraes, T. S. J., ... & Piccoli, R. H. (2021). Essential oil nanoemulsions for the control of *Clostridium sporogenes* in cooked meat product: An alternative?. *LWT*, 143, 111123.

Pinillos, M. A. et al. (2003). Intoxicación por alimentos, plantas y setas. *Anales del Sistema Sanitário de Navarra*, Pamplona, v.26, suppl. 1, p.71-76.

Przybylska, A. (2002). Botulism in Poland in 2001. *Przegl Epidemiologiczny*, Warsaw, v. 56, n. 3, p. 305 – 310.

Roberts, J. A. (2000). Economic aspects of food-borne outbreaks and their control. *British medical bulletin*, 56:133–141.

Roberts, T .A. & Gibson, A. M. (1986). Chemical methods for controlling pathogens in processed meats. *Food Technology* , Champaign, v.40, p.163- 176.

Ruusunen, M.; Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, v.70, p. 531–541.

Schocken-Iturrino, R.P. et al. (1999). Study of presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brasil. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam, v.24, p.379–382.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE SANTA CATARINA. (2011). Saúde confirma surto de botulismo em Santa Catarina, 2011. Disponível em: http://portalses.saude.sc.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1297:saude-confirma-surto-de-botulismo-em-santa-catarina&catid=625:ascom-assessoria-de-comunicacao-2011&Itemid=430.

Acessado em: 03 de Outubro de 2016.

Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, v.101, n.3, 514–525.

Shapiro, R. L., Hatheway, C. & Swedlow, D. L. (1998). Botulism in the United States: A clinical and epidemiologic review. *Annals Internal Medicine*, v.129, p.221–228.

Shukla, H. D. & Sharma, S. K. (2005). *Clostridium botulinum*: A Bug with Beauty and Weapon. *Critical reviews in microbiology*, v.31, p.11-18.

Sidone, M. G.; Haguwara, M. M. H.; Marquezini, M. G.; Yotsuyanagi, S. E. & Lemos, A. L. S. C. (2016). Estabilidade microbiológica de mortadela de baixo custo estável em temperatura ambiente - impactos da atividade de água e do teor de nitrito adicionado. *Anais 10º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2016, Campinas, São Paulo*.

Silva et al. (2010). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. Varela, 4 ed.

Silva, D. R., Haddad, G. B., de Moura, A. P., de Souza, P. M., Ramos, A. L., Hopkins, D. L., & Ramos, E. M. (2021). Safe cured meat using gamma radiation: Effects on spores of *Clostridium sporogenes* and technological and sensorial characteristics of low nitrite cooked ham. *LWT*, 137, 110392.

Sofos, J. N., Beuchat, L. R., Davidson, P. M., & Johnson, E. A. (1998). Naturally occurring antimicrobials in food. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 28(2), 71-72.

Stephen, S.A. (2001). Botulinum toxin as a biological weapon. *Journal of American Medical Association, Chicago*, v.285, n.8, p.43-49.

Stopforth, J.D., Sofos, J.N. & Busta, F.F. (2005). Sorbic acid and sorbates. In: Davidson, J.N.S.P.M., B, A.L. (Eds.), *Antimicrobials in Food*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 49-90.

Stringer, S. C. & Pin, C. (2005). *Microbial risks associated with salt reduction in certain foods and alternative options for preservation: Technical report*. Norwich, UK: Institute of Food Research, 50p.

Taylor, R. H., Dunn, M. L., Ogden, L. V., Jefferies, L. K., Eggett, D. L., & Steele, F. M. (2013). Conditions associated with *Clostridium sporogenes* growth as a surrogate for *Clostridium botulinum* in nonthermally processed canned butter. *Journal of dairy science*, 96(5), 2754-2764.

Thirunavukkarasu, N., Johnson, E., Pillai, S., Hodge, D., Stanker, L., Wentz, T., Singh, B., Venkateswaran, K., McNutt, P., Adler, M., Brown, E., Hammack, T., Burr, D., & Sharma S. (2018). Botulinum neurotoxin detection methods for public health response and surveillance. *Front Bioeng Biotechnol* 6:80.

Tompkin, R. B. (2005). Nitrite. In P. M. Davidson, J. N Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 169e236). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Tompkin, R. B., Christiansen, L. N., & Shaparis, A. B. (2005). Antibotulinal role of isoascorbate in cured meat. *Journal of Food Science*, v.43, n.5, p.1368-1370.

Townsend, C. T., Esty, J. R., & Baselt, F. C. (1983). Heat-resistance studies on spores of putrefactive anaerobes in relation to determination of safe processes for canned foods. *Journal of Food Science.*, v.3, p.323–346.

USDA. 2005. Food safety regulatory essentials: shelf stable. Principles of preservation of shelf stable dried meat products. Available at: <http://www.meathaccp.wisc.edu/validation/assets/Principles%20for%20preservation.pdf>. Accessed 2 October 2014.

Viuda-Martos, M.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J. A. (2012). Mechanical deboning. P.457-468. In: *Handbook of Meat and Meat Processing*, Second Edition. HUI, Y. CRC Press.

WHO. (1997). Evaluation of some food additives and contaminants. Technical Report Series, n. 868.

Woods, L.F., Wood, J.M., (1982). A note on the effect of nitrite inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Bacteriol.* 52, 109–110.

Yu, P.A., Lin, N.H., Mahon, B.E., Sobel, J., Yu, Y., Mody, R.K., Gu, W., Clements, J., Kim, H.J., & Rao, A.K. (2018). Safety and improved clinical outcomes in patients treated with new equine-derived heptavalent botulinum antitoxin. *Clinical Infectious Diseases*, 66:S57–S64.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DO ERITORBATO E NITRITO RESIDUAL NA ESTABILIDADE E
SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA FRENTE AO *CLOSTRIDIUM*
SPOROGENES PA 3679 EM MORTADELA COMERCIALIZADA EM
TEMPERATURA AMBIENTE**

Trabalho a ser enviado para “Journal of food Science and technology”

RESUMO

A importância do nitrito e eritorbato na segurança de produtos cárneos é conhecida a muitos anos, porém, este conhecimento deve ser constantemente renovado de forma a acompanhar o desenvolvimento de produtos. Neste contexto, há uma limitação de estudos que avaliam o impacto destes aditivos em produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente, formulados com altas porcentagens de CMS (carne mecanicamente separada) e com diferentes atividades de água (a_w). De modo a contribuir com este conhecimento, o presente estudo avaliou o efeito da adição de nitrito e eritorbato em mortadela comercializada em temperatura ambiente e com diferentes a_w frente à germinação de esporos e crescimento de *Clostridium sporogenes* PA 3679, usado como *surrogate* do *Clostridium botulinum* proteolítico (tipo I). Os tratamentos avaliados foram: sem nitrito, sem eritorbato e a_w 0,95 (SNSE); sem nitrito, com eritorbato e a_w 0,95 (SNCE); com nitrito, sem eritorbato e a_w 0,95 (CNSE); com nitrito, com eritorbato e a_w 0,95 (CNCE); e com nitrito, com eritorbato e a_w 0,97 (controle). As análises físicas, químicas e microbiológicas foram realizadas após 1, 15, 30, 60 e 90 dias de estocagem a 25°C. O tratamento CNSE apresentou um teor de nitrito residual maior que o tratamento CNCE e controle ($p < 0,05$), indicando que a presença de eritorbato acelerou a depleção de nitrito. Não houve alteração ($p > 0,05$) da contagem do inóculo ao longo do período de estocagem para todos os tratamentos com a_w 0,95 (SNSE, SNCE, CNSE e CNCE), permanecendo ao redor de 3 log CFU/g. Por outro lado, o tratamento controle apresentou contagem de 5,61 log CFU/g e 6,78 log CFU/g de esporos e células vegetativas de *C. sporogenes* após 60 e 90 dias, respectivamente. Isto indica que houve germinação em a_w 0,97, mesmo na presença de nitrito e eritorbato. Portanto, os resultados do estudo evidenciam que a a_w foi o fator intrínseco preponderante ($p < 0,05$) para o controle de germinação e crescimento de *C. sporogenes* PA 3679 em mortadela com alto teor de CMS e comercializada em temperatura ambiente. O nitrito e o eritorbato não proporcionaram efeito ($p > 0,05$) antimicrobiano adicional.

Palavras-chave: atividade de água, botulismo, antioxidante, segurança de alimentos.

1. Introdução

A segurança e estabilidade microbiológica dos alimentos, inclusive de produtos cárneos, são determinados por diferentes parâmetros, tais como tratamento térmico, pH, a_w , temperatura de conservação e presença de conservantes. Estas barreiras podem estar presentes de forma isolada ou em sinergismo no alimento (Singh e Shalini, 2016). A mortadela comercializada em temperatura ambiente é um produto pasteurizado e embalado à vácuo (anaerobiose). Dentre as diferentes formulações existentes no mercado, as elaboradas com 60% de CMS (carne mecanicamente separada) e 10% de miúdos apresentam relevância pelos altos volumes de comercialização no Brasil, onde a desigualdade social favorece a venda de produtos de baixo custo.

Uma vez que produtos comercializados em temperatura ambiente não possuem a cadeia de frio como uma barreira contra o *C. botulinum*, o controle deve ser exercido por outros fatores intrínsecos e/ou extrínsecos, como pH, atividade de água e adição de conservantes. Em muitos casos, a a_w é considerada o principal parâmetro responsável pela estabilidade do alimento, pela modulação da resposta microbiana e pela determinação do tipo de microrganismo encontrado no alimento (Tapia et al., 2020).

Clostridium botulinum (*C. botulinum*) é uma bactéria Gram positiva, bastonete anaeróbio estrito, formador de esporos, superóxido dismutase positivo e catalase negativa. As cepas do Grupo I (proteolítico), cujos esporos são resistentes ao calor, podem germinar e proliferar em $a_w > 0,94$ (10% NaCl) e pH $> 4,6$ (Talon et al., 2015). O nitrito de sódio (NaNO_2), em combinação com o cloreto de sódio (NaCl), tem sido usado por décadas em carnes processadas, como um inibidor de *C. botulinum* (Kolodziejaska et al., 1990).

O nitrito contribui para o estresse oxidativo das bactérias por ser o precursor do íon peroxinitrito (ONOO^-), formando o sistema nitrato-nitrito-peroxinitrito que é dependente de pH alto e baixa pressão de oxigênio (Majou e Christieans, 2018). Os resultados apresentados por Woods, Wood e Gibbs (1981) sugeriram que o óxido nítrico produzido a partir de nitritos inibe o sistema fosforoclástico em *C. sporogenes* que eventualmente resulta em rápida diminuição do ATP intracelular. Todavia, a eficácia do nitrito como parte da tecnologia de obstáculo depende de outros fatores,

incluindo cloreto de sódio (acelera a autooxidação da oximioglobina e promove a formação do peroxinitrito), ascorbato (aumenta a síntese de peroxinitrito) e atividade de água (a_w) (Majou e Christieans, 2018).

A utilização do eritorbato associado ao nitrito não só acelera e estabiliza a cor característica das carnes curadas, como possui um efeito sequestrante no cátion do ferro, aumentando a eficiência antibotulínica do nitrito (Tompkin et al., 1979). Tompkin et al. (1978) demonstraram que a adição de ascorbato em produtos cárneos curados aumenta a prevenção contra a formação de toxina botulínica. Baseado nessa informação, os autores propuseram que o efeito anti-bolutilinico seria devido à habilidade do ascorbato em quelar alguns cátions essenciais necessários para o *C. botulinum* se recuperar das injúrias induzidas pelo nitrito.

Osterbauer et al. (2017) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de nitrito e eritorbato sobre o crescimento de *C. perfringens* durante o resfriamento prolongado de presunto curado. Como esperado, o aumento da concentração de eritorbato em combinação com o nitrito resultou em um aumento na inibição do microrganismo durante o resfriamento. Os autores relataram que no tratamento com 100 mg/kg de nitrito e sem adição de eritorbato, a população de *C. perfringens* aumentou de maneira similar ao controle (sem nitrito). Enquanto no tratamento com 100 mg/kg de nitrito e adição de eritorbato de sódio (500ppm) houve diminuição do crescimento, indicando que o eritorbato é um importante agente redutor em produtos curados, atuando como acelerador de cura e prevenindo o crescimento de *C. perfringens* (Osterbauer et al., 2017).

O USDA (*United States Department of Agriculture*) permite uma concentração de 156 mg/kg de nitrito de sódio ou potássio em produtos cominuídos, 200 mg/kg de nitrito em produtos massageados, bombeados ou curados por imersão e no máximo 547 mg/kg de eritorbato ou ascorbato em produtos derivados de carne e frango (USDA, 1995). Segundo a EFSA (*European Food Safety Authority*, 2017), a quantidade máxima de adição permitida de acordo com o Regulamento Europeu (EC) n. 1333/2008 é 150 mg/kg para os produtos cárneos curados pasteurizados.

A maior parte dos produtos curados contém concentrações perto do limite máximo regulado de nitrito e eritorbato/ascorbato, entretanto, um crescente número de produtos prontos para consumo vem sendo elaborado com fontes vegetais

alternativas de nitrito, tais como aipo fermentado. Além disso, utilizam ascorbato proveniente de acerola em pó como acelerador de cura para substituir o eritorbato (Choi et al., 2020). Geralmente, esses produtos denominados *clean label* apresentam concentrações mais baixas de nitrito e aceleradores de cura do que os produtos curados de forma convencional (King et al., 2016).

Dessa forma, o *C. botulinum* proteolítico deve ser considerado como um perigo a ser avaliado nos processos produtivos da mortadela comercializada em temperatura ambiente, visto que este produto é formulado com altas porcentagens de CMS, submetido à pasteurização, embalado à vácuo e comercializado em temperatura ambiente. A atividade de água e a presença de conservantes e aceleradores de cura seriam as principais barreiras parametrizadas para inibir uma possível germinação de esporos de *C. botulinum*. Para a avaliação dos efeitos antimicrobianos destes parâmetros, *C. sporogenes* tem sido utilizado em estudos científicos como substituto do *C. botulinum* do Grupo I, uma vez que não é patogênico, nem produtor de neurotoxina e apresenta as mesmas características do *C. botulinum* (Janganan et al., 2016). Deste modo, o objetivo do estudo foi avaliar o impacto de nitrito de sódio e eritorbato de sódio sobre *C. sporogenes* PA3679 inoculado em mortadela comercializada em temperatura ambiente com diferentes atividades de água.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo do inóculo e inoculação das amostras

A cepa *C. sporogenes* PA3679 (ATCC 7955) foi utilizada como *surrogate* de *C. botulinum* do Grupo I (Janganan et al., 2016), a mesma foi obtida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A manutenção da cultura foi realizada em *Cooked Meat Medium* (Acumedia, Neogen, Lansing, EUA) a 4°C. O preparo da solução de esporos foi realizado conforme Mah et al. (2008). A solução de esporos de *C. sporogenes* foi preparada inoculando-se 1 µL da cultura ativa em 10 mL de caldo TPGY [(trypticase peptone-glucose yeast extract broth) (50 g tryptone (Acumedia), 20 g bacto yeast extract (Difco, Sparks, EUA), 5 g peptone (Acumedia), 6 g dextrose (C₆H₁₂O₆, Êxodo, Brasil) e 1 g tioglicolato de sódio (C₂H₃NaO₂S, Vetec Química, Brasil), em 1 litro de

água destilada)]. Em seguida, foi realizada incubação em anaerobiose a 32°C por 2 dias.

Após a incubação, foi transferida uma alíquota de 1 mL do cultivo para 100 mL de caldo TPGY, seguido de nova incubação. Então, uma alíquota de 10 mL deste cultivo foi transferida para 1L de caldo TPGY e esse foi incubado nas mesmas condições anteriores. Após esta última incubação, a cultura foi centrifugada a 14.000 rpm, a 4°C, por 10 min, seguida por três lavagens sucessivas em solução salina a 0,85%. O precipitado foi ressuspensão em 100 mL do meio para esporulação [60 g triptona (Acumedia), 1 g dextrose (Êxodo) e 1 g de tioglicolato de sódio (Vetec Química) suplementado com 5 g calcium carbonate (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em 1 litro de água destilada, pH 5,0]. Em seguida, todo esse volume foi incorporado a 900 mL de meio de esporulação e incubado sob anaerobiose a 32°C por 10 dias. Então, foi realizada outra centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente e o precipitado obtido foi ressuspensão em 100 mL de solução tampão [5.675 g fosfato de sódio (Na_2HPO_4 , Êxodo) e 3,63 g fosfato de potássio (K_2HPO_4 , Êxodo) em 1L de água destilada, pH 7,0]. A metodologia utilizada para a contagem dos esporos presentes na suspensão do inóculo está descrita no item 2.3, a concentração final de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 foi de aproximadamente 10^5 esporos/mL.

2.2 Processamento das amostras de mortadela

Foram elaborados cinco tratamentos: 1) SNSE: sem nitrito, sem eritorbato e a_w 0,95; 2) SNCE: sem nitrito, com eritorbato e a_w 0,95; 3) CNSE: com nitrito, sem eritorbato e a_w 0,95; 4) CNCE: com nitrito, com eritorbato e a_w 0,95; 5) CONTROLE: com nitrito, com eritorbato e a_w 0,97.

A emulsão de mortadela foi elaborada a partir da mistura de CMS (60%) retalhos suínos (16,4%) gel de pele suína (água:pele na proporção de 2 partes de água para uma de pele) (12%), proteína texturizada de soja (3,5%), açúcar (0,6%), amido (5%), tripolifosfato de sódio (0,3%), pirofosfato ácido de sódio (0,15%). A partir da determinação da umidade na emulsão foi determinada a concentração salina correspondente à atividade de água desejada. Aplicando-se a Equação 1. A Na emulsão básica adicionou-se sal e demais aditivos (sal de cura e eritorbato de sódio), conforme formulações apresentadas na Tabela 1. Inicialmente, a carne congelada foi

moída em discos de 12 mm (Hermann, 106, São Paulo, Brasil), transferida para um cortador (Kramer & Grebe Karl Ernst Zippel, Biedenkopf-Wallau, Alemanha) e homogeneizada. Uma amostra foi retirada para análise de esporos de clostrídio sulfito redutor (Item 2.2.3) para garantir que não havia presença de esporos de *Clostridium* spp na matéria-prima. Em seguida, foi realizada a inoculação de 1 ml de suspensão de esporos de *C. sporogenes* PA3679 por quilo de emulsão. Logo após, foram adicionados os demais ingredientes que constam na Tabela 1. A emulsão foi homogeneizada no cortador até atingir 10-12°C.

Para obtenção dos cinco tratamentos, a emulsão foi dividida da seguinte forma:

Figura 1. Esquema de elaboração de amostras de acordo com os tratamentos.

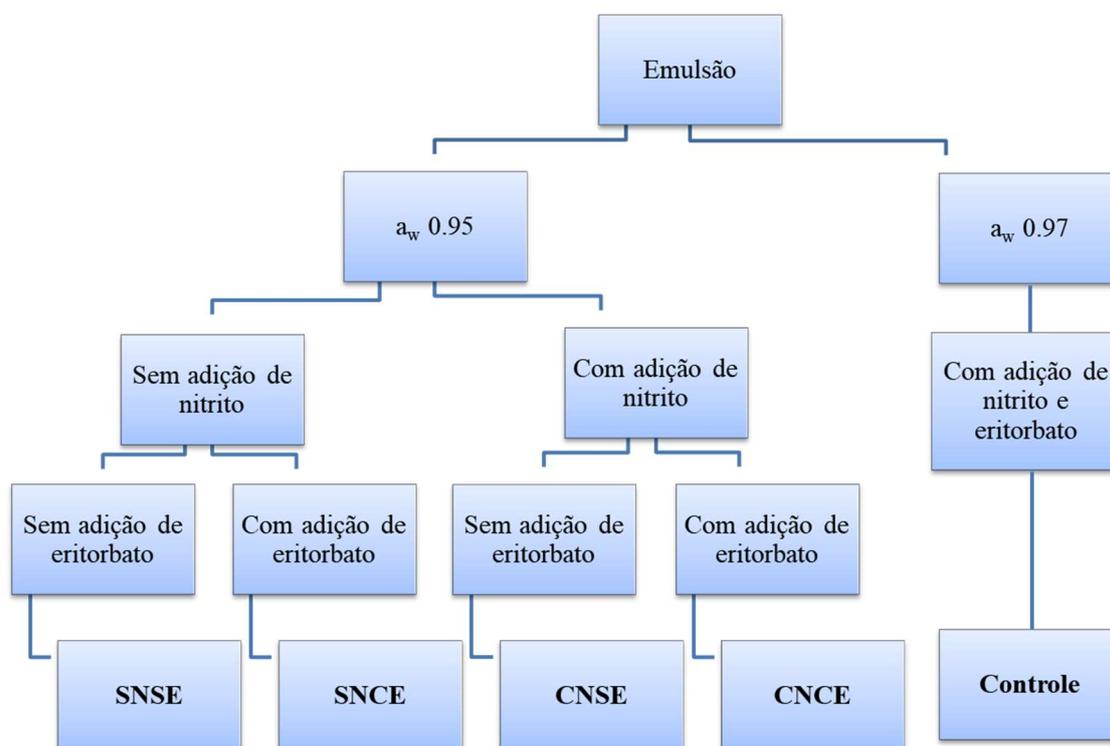


Tabela 1. Formulação da emulsão básica (mortadela) de cada tratamento.

Ingredientes	Emulsão	Controle	SNSE	SNCE	CNSE	CNCE
CMS (cedida pela BRF Foods, Uberlândia, MG, Brasil)	60,00	58,33	57,33	57,31	57,32	57,30
Gel de pele de porco (água:pele) (2:1), fornecida pela BRF Foods, Uberlândia, MG, Brasil)	12,00	11,69	11,47	11,46	11,46	11,46
Rim de porco	1,00	0,97	0,96	0,96	0,96	0,96
Fígado de porco	1,00	15,98	0,96	0,96	0,96	0,96
Carne suína	16,40	3,41	15,67	15,66	15,67	15,66
Proteína texturizada de soja (Centex 4010, St. Louis, United States)	3,50	4,87	3,34	3,34	3,34	3,34
Amido de mandioca (Tipo I, Pinduca, Brasil)	5,00	0,58	4,78	4,78	4,78	4,78
Açúcar refinado (União, Camil Alimentos, Barra Bonita, Brasil)	0,60	0,34	0,57	0,57	0,57	0,57
Tripolifosfato de sódio (Brifisol 550, ICL, Brasil)	0,35	0,15	0,33	0,33	0,33	0,33
Pirofosfato ácido de sódio (Fibrisol 414, ICL, Brasil)	0,15	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14
Sal cura (90% NaCl / 10% nitrito de sódio) (Kraki Kienast & Kratschmer Ltda, Santo André, Brasil)	0,00	0,15	0,00	0,00	0,15	0,15
Eritorbato de sódio (Kraki Kienast & Kratschmer Ltda, Santo André, Brasil)	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,04
Cloreto de sódio (Cisne, Cabo Frio, Brasil)	0,00	2,40	4,45	4,45	4,31	4,31

CMS: carne mecanicamente separada.

A umidade da emulsão foi determinada por metodologia rápida em micro-ondas (Pettinati, 1975) para possibilitar os cálculos de ajuste de a_w , conforme cada um dos tratamentos. O cálculo aplicado foi a equação de Krispien, Rodel e Leistner (1979) modificada para ajuste da a_w :

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

Onde: CS – Concentração salina no produto (%NaCl / %NaCl + %Umidade).

NaCl foi adicionado nas quantidades calculadas em cada um dos tratamentos para ajuste de a_w de 0,95 e 0,97, além do nitrito e eritorbato nos tratamentos correspondentes (Figura 1). Após a homogeneização da emulsão, a mesma foi embutida em tripa plástica impermeável (taxa de permeabilidade ao oxigênio – TPO₂ de 19,14 ml/m/dia). O regime de cozimento foi de 85°C com vapor direto em estufa (HR 1, Schröter, Borgholzhausen, Alemanha), até que o interior do produto atingisse 75°C. Após o cozimento o produto foi mantido durante 15 minutos em água corrente a temperatura ambiente.

As amostras foram estocadas em câmaras a 25±1°C. As análises de composição centesimal, a_w e caracterização microbiológica (*Salmonella* sp., estafilococos coagulase positivo, *Escherichia coli* e clostrídio sulfito redutor a 46°C) foram realizadas 1 dia após o processamento. O estudo de vida útil foi realizado em duas repetições de processamento, para cada análise foram utilizadas triplicatas de amostras em cada repetição, totalizando 6 amostras por tratamento. Nos dias 1, 15, 30, 60 e 90, as análises realizadas foram: nitrito, nitrato, pH, clostrídio sulfito redutor (esporos e células vegetativas), bactérias lácticas e enterobactérias.

2.3 Análises microbiológicas

Para cada tempo de estocagem foram analisadas três embalagens de cada tratamento. A contagem de esporos e células vegetativas de *C. sporogenes* foi realizada na suspensão de esporos, na matéria prima cárnea e nas amostras inoculadas, de acordo com Labbe (2015). Amostras de 25 g foram homogeneizadas em 225 ml de água peptonada a 0,1% (Acumedia). Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas e plaqueamento em profundidade em SFP ágar (Difco,

EUA), com incubação em anaerobiose a 37°C por 48 h. Para contagem de esporos, as mesmas diluições foram submetidas a choque térmico a 80°C por 12 min em banho-maria, seguido por banho de gelo por 5 min. Em seguida, foi feito plaqueamento e incubação, conforme descrito anteriormente. O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mL (suspensão de esporos) ou g (matéria primas cárnea e amostras inoculadas da segunda etapa) log UFC/mL.

As contagens de bactérias lácticas foram realizadas de acordo com a ISO 15214 (1998b) e enterobactérias de acordo com Kornacki et al. (2015). Os resultados foram expressos em log UFC/g. Análises adicionais foram realizadas na mortadela cozida (Dia 1). *Escherichia coli* foi analisada de acordo com a ISO 7251 (2005), e os resultados foram expressos em Número Mais Provável (NMP/g); *Salmonella* sp. foi avaliada de acordo com a ISO 6579 (2007); estafilococcus coagulase-positivo segundo Bennett et al. (2015) e *Listeria monocytogenes* de acordo com a ISO 11290-2 (1998a).

2.4 Análises físico-químicas

As unidades experimentais do estudo foram amostras de 90 ± 5 g cada. Para as análises físico-químicas foram amostradas duas peças (duplicata de amostra) de cada tratamento por tempo em cada uma das duas repetições de processamento (n=4).

A composição centesimal foi analisada de acordo com AOAC (2005), assim o teor de proteínas foi avaliado pelo método 981.10, a umidade pelo método 985.14, cinzas foram avaliadas pelo método 920.153 e gordura total pelo método 991.36; os carboidratos foram determinados por titulação de acordo com Brasil (2018). A atividade de água foi determinada no produto final utilizando o analisador Aqualab 4TE (Decagon Devices, EUA) a $25,0 \pm 0,3$ °C.

O pH foi determinado utilizando pHmetro (Digimed modelo DM21, Brasil) com eletrodo de perfuração (Digimed, Brasil). O teor de nitrito (mg/kg) foi determinado por espectrofotometria, conforme descrito em Brasil (2005), assim a absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de nitrito calculada a partir da interpolação na curva padrão, utilizando uma solução padrão de nitrito de sódio.

2.5 Análise estatística

Os dados coletados nos experimentos foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias dos tratamentos ($p < 0,05$) usando SAS (V.9.1 SAS Inst. Inc., Cary, NC). O modelo estatístico incluiu os tratamentos e o tempo de armazenamento como efeitos fixos. Valores médios e erro padrão das médias foram relatados.

3. Resultados e discussão

As amostras de mortadela apresentaram a seguinte composição centesimal: umidade de $60,1 \pm 2,1$ g/100g, $14,2 \pm 1,6$ g/100g de gordura, $14,0 \pm 0,8$ g/100g de proteína, $5,7 \pm 0,7$ g/100g de cinzas e $7,9 \pm 1,0$ g/100g de carboidratos. A atividade de água nos quatro tratamentos (SNSE, SNCE, CNSE e CNCE) foi de $0,95 \pm 0,01$ e no controle foi de $0,97 \pm 0,00$, o que comprova a eficácia da equação de Krispien, Rodel e Leistner (1979) modificada. Os valores de pH dos tratamentos variaram de 5,9 a 6,2, segundo Johnson (2013) o pH mínimo para crescimento do *C. botulinum* é 4,6.

Nas amostras sem nitrito (SNSE e SNCE) a quantificação deste composto foi abaixo do limite de detecção (Tabela 2). Nos tratamentos com adição de 150 mg/kg observa-se que no dia 1 que entre 33 e 45% aproximadamente do nitrito adicionado foi consumido, um percentual inferior ao relatado por Honikel (2008) em produtos europeus elaborados com carne suína, que reduzem geralmente 65% do teor adicionado. Independentemente das concentrações iniciais de nitrito adicionado, sendo consumida durante as etapas de mistura, embutimento e processo térmico A menor depleção observada no presente estudo (~35%) pode ser atribuída à predominância de CMS como matéria-prima na mortadela de baixo custo comprometendo as reações de cura.

Além disso, pode-se inferir que a presença de eritorbato acelerou a depleção do nitrito durante as primeiras 24h, uma vez que o tratamento CNSE apresentou valores maiores ($p < 0,05$) do composto em comparação ao CNCE e ao controle. O uso do ascorbato resulta em uma depleção mais rápida do nitrito residual durante o processo de cura, como resultado da redução de nitrito para óxido nítrico pelo ascorbato (Izumi et al., 1989). Em presunto cozido curado, Osterbauer et al. (2017) observaram que nos tratamentos com menor concentração de eritorbato, a concentração de nitrito residual era maior. Em relação à depleção ao longo do tempo

de estocagem, observa-se que houve uma diminuição progressiva dos teores de nitrito ($p < 0,05$) em todos os tratamentos.

Tabela 2. Concentração de Nitrito (ppm) na emulsão crua e na mortadela ao longo da estocagem a 25°C por até 90 dias.

Tempo	SNSE	SNCE	CNSE	CNCE	CONTROLE
1	***	***	99,74 Aa	81,84 Ab	85,74 Ab
15	***	***	21,32 Ba	13,77 Bab	9,36 Bb
30	***	***	5,61 Ca	4,67 Ca	5,05 Ba
60	***	***	4,45 Ca	4,55 Ca	3,73 Bb
90	***	***	4,52 Ca	4,25 Ca	3,06 Bb

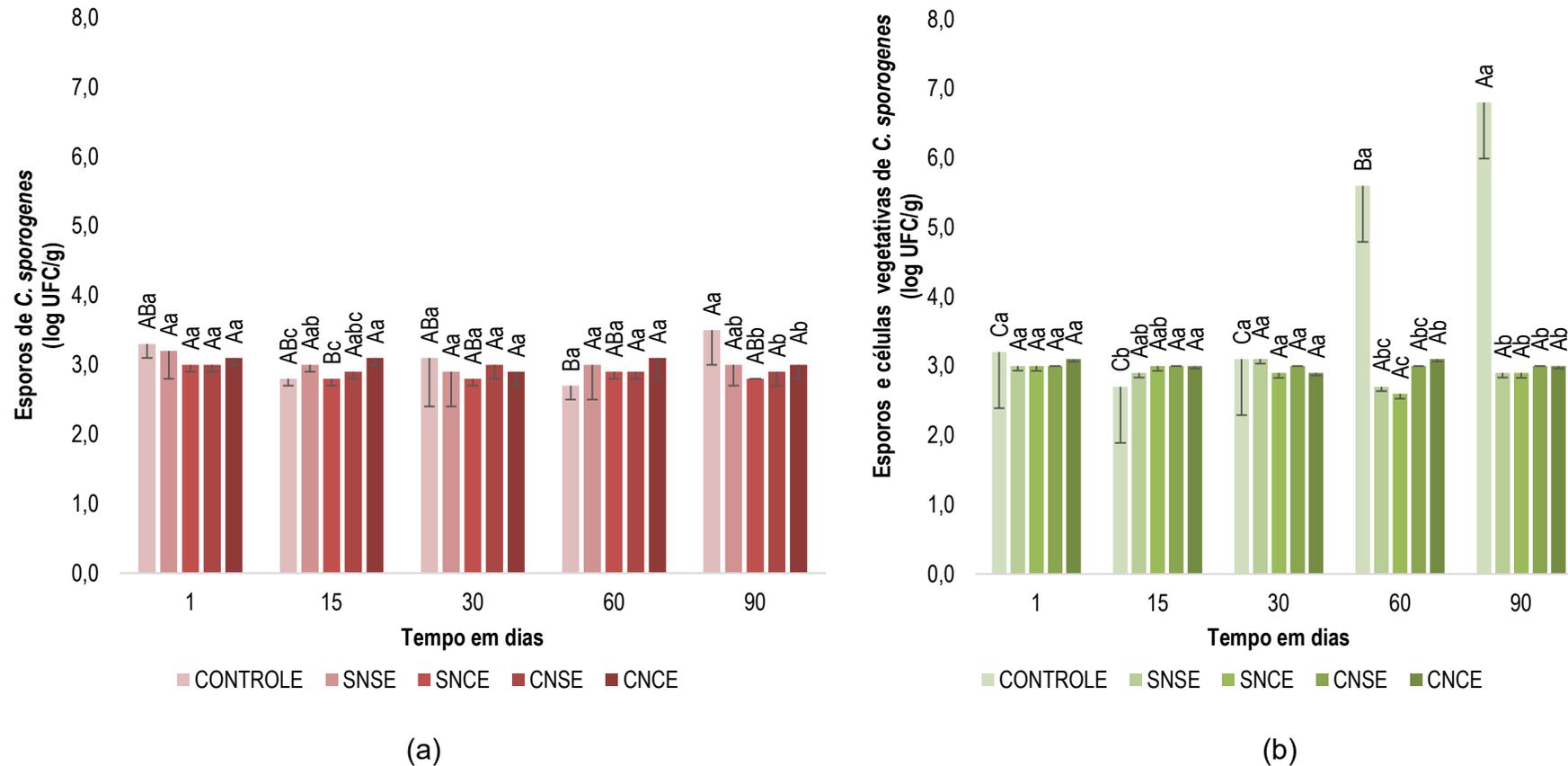
***Abaixo do limite de detecção. Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os tempos ($p < 0,05$). Valores são a média \pm desvio padrão. SNSE: sem nitrito; sem eritorbato, SNCE: sem nitrito; com eritorbato, CNSE: com nitrito; sem eritorbato, CNCE: com nitrito; com eritorbato e Controle: com nitrito, com eritorbato e a_w 0,97.

Os resultados microbiológicos apresentaram-se dentro dos padrões da Instrução Normativa nº 60 da ANVISA (Brasil, 2019), conforme apresentado a seguir: contagem de *E. coli* $< 3,0$ NMP/g, estafilococcus coagulase positiva $< 1,0$ log UFC/g, *Salmonella* sp. ausente em 25 g e clostridio sulfito redutor a 46°C $< 1,0$ log UFC/g. As contagens de bactérias lácticas e enterobactérias se mantiveram abaixo do limite de detecção ($< 1,0$ log UFC/g) ao longo da vida útil à temperatura de estocagem de 25°C.

A emulsão cárnea antes da inoculação apresentou contagem de clostrídio sulfito redutor abaixo do limite de detecção ($< 1,0$ log UFC/g) microrganismo. Após a inoculação a contagem foi de 3,5 log UFC/g de *C. sporogenes* PA 3679. Nos tratamentos com a_w 0,95 (SNSE, SNCE, CNSE e CNCE) tanto a contagem de esporos (Figura 3a) quanto a contagem de esporos e células vegetativas de *C. sporogenes* (Figura 3b) permaneceram próximos a 3,0 log UFC/g ao longo de 90 dias.

O controle (a_w 0,97) apresentou contagens de 2,7 a 3,5 log UFC/g de esporos de *C. sporogenes* ao longo de 90 dias. Contudo, tal tratamento apresentou contagens de células vegetativas e esporos de *C. sporogenes* significativamente maiores ($p < 0,05$) que os demais tratamentos aos 60 e 90 dias de estocagem, 5,6 a 6,5 log UFC/g, respectivamente (Figura 3). Estes resultados indicam que houve germinação dos esporos apenas no tratamento controle que apresentava maior a_w (0,97) em

comparação aos demais tratamentos com a_w 0,95, independentemente da presença de nitrito ou eritorbato de sódio. Isto sugere que a a_w foi o fator dominante na inibição da germinação e do crescimento de *C. sporogenes*.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos dentro de cada tempo ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos dentro de cada tratamento ($p < 0,05$). Os valores são a média de seis amostras por tratamento. SNSE: sem nitrito, sem eritorbato e a_w 0,95; SNCE: sem nitrito, com eritorbato e a_w 0,95; CNSE: com nitrito, sem eritorbato e a_w 0,95; CNCE: com nitrito, com eritorbato e a_w 0,95; e CONTROLE: com nitrito, com eritorbato e a_w 0,97.

Figura 3. Contagem de esporos (a) e esporos mais células vegetativas (b) de *C. sporogenes* PA 3679 (log UFC/g) em mortadela artificialmente inoculada e estocada a 25°C por até 90 dias.

Os produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente, com exceção dos enlatados, são avaliados quanto à vida útil e segurança microbiológica na temperatura de conservação descrita no rótulo, que no Brasil é de aproximadamente 25°C. Todavia, segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), a temperatura máxima registrada no país em 2020 foi 44,6°C (BRASIL, 2020). Isto indica que em muitas localidades e situações, como por exemplo, durante o transporte, os produtos são expostos a condições de abuso, podendo favorecer a germinação e desenvolvimento do *C. botulinum* proteolítico.

Ademais, uma particularidade das mortadelas comercializadas em temperatura ambiente no Brasil que aumentam o risco microbiano é a formulação do produto. Estas mortadelas são compostas por até 60% de CMS e 10% de miúdos (estômago, coração, língua, fígado, rins e miolos), pele e tendões (Brasil, 2000). Sabe-se que uma grande parcela dos miúdos ofertados para o consumo humano e utilizados como matéria-prima de produtos cárneos são de baixa qualidade microbiológica (Gill e Jones, 1992). Em relação à CMS, o processo de separação mecânica resulta na trituração dos ossos e consequente liberação da medula, rompendo células e tornando a CMS um meio favorável a reações bioquímicas e ao desenvolvimento de microrganismos (Brasil, 2000).

Segundo o *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 2011), a segurança e a estabilidade de produtos cárneos curados comercializados em temperatura ambiente dependem do efeito combinado da destruição térmica ou injúria de um pequeno número de esporos e a inibição dos esporos sobreviventes pela adição de quantidade adequada de sal e nitrito de sódio. Todavia, mudanças recentes na preferência dos consumidores pelos alimentos minimamente processados com características de natural, como produtos com baixo teor de sal, sem aditivos, minimamente tratados termicamente e embalados a vácuo; aumentaram o risco de botulismo de origem alimentar. Ressalta-se que a adição de sal está diretamente relacionada à redução de atividade de água, a qual no presente estudo apresentou-se como importante fator de inibição do crescimento e da germinação de esporos de *C. sporogenes* PA 3679.

Na avaliação de espetinhos cozidos comercializados em temperatura ambiente embalados à vácuo, sem e com irradiação (0,36, 3,0 and 0,29 kGy), foi constatado que a a_w 0,85 impediu o crescimento de *C. sporogenes*, durante o armazenamento a 37°C por 90 dias (Chawla & Chander, 2004). De acordo com Lara et al (2003) a baixa a_w do charque (0,70-0,75) inibe o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico e *C. botulinum* proteolítico tipo B, assim como a produção de suas respectivas toxinas.

Um estudo avaliou quatro tipos de massa fresca (tortellini recheada com carne ou queijo, macarrão linguine e fettuccine) preparadas com diferentes a_w (Glass & Doyle, 1991). As amostras foram inoculadas com esporos de *C. botulinum*, embaladas sob atmosfera modificada e estocadas a 4 ou 30°C por 8 a 10 semanas (Glass & Doyle, 1991). Não foi detectada neurotoxina nos produtos armazenados a 4°C por até 8 semanas. No armazenamento a 30°C, a presença de toxina foi registrada em tortellini de carne com a_w 0,99 e 0,95 após 2 e 6 semanas, respectivamente. Contudo, a toxina não foi detectada em tortellini com $a_w \leq 0,94$ e armazenado na mesma temperatura de abuso por 10 semanas. Os autores concluíram que a a_w foi o principal fator de prevenção da produção de toxina botulínica pelo *C. botulinum* proteolítico em temperatura ambiente.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a presença de nitrito e eritorbato em mortadela comercializada em temperatura ambiente com a_w 0,95 não apresentou efeito adicional sobre o *C. sporogenes* PA 3679 usado como um *surrogate* do *C. botulinum*. Alguns estudos corroboram com estes resultados, Hospital et al (2016) estudaram salames (*dry fermented sausages*), nos quais fatores como pH, a_w e microbiota competitiva exerceram efeito mais relevante que o nitrito na inibição do crescimento e produção de toxina por *C. botulinum*. Os pesquisadores avaliaram dois tipos de salames (*salchichón* e *fuet*) que foram inoculados com esporos de *C. botulinum* Grupo I (proteolítico) e Grupo II (não proteolítico), as amostras foram preparadas com 150 mg/kg de NaNO₃ e 150 mg/kg de NaNO₂ e com 25% e 50% de redução, além dos tratamentos sem nitrito/nitrato.

O pH final dos produtos foi de 5,0 no *salchichón* e de 5,2 no *fuet*, a contagem de bactérias lácticas atingiu 8-9 log UFC/g após a fermentação e a_w ao final da maturação foi de 0,88-0,90. A neurotoxina botulínica não foi detectada

em nenhuma das amostras, incluindo as formuladas sem nitrito/nitrato. Os autores relataram que apesar da temperatura ambiente (12°C a 22°C, dependendo da fase de maturação e produto) estar dentro da faixa de germinação e crescimento do *C. botulinum* proteolítico, outros parâmetros inibiram a formação de toxina. Eles concluíram que embora diminuir ou mesmo remover nitrato/nitrito da fórmula não tenha comprometido a segurança em relação ao *C. botulinum* nas condições testadas, sua ação antimicrobiana não deve ser subestimada, uma vez que a mesma é ampla, agindo sobre diferentes gêneros bacterianos e, além disso, os outros obstáculos tecnológicos empregados podem eventualmente falhar em sua proteção (Hospital et al, 2016).

4. Conclusões

Nas condições experimentais avaliadas os resultados indicaram que a a_w foi o fator intrínseco preponderante para o controle da germinação e crescimento de *C. sporogenes* PA 3679 em mortadela comercializada em temperatura ambiente e que o nitrito e eritorbato não proporcionaram efeito antimicrobiano adicional aparente. Entretanto, estudos adicionais são necessários para melhor entendimento do sinergismo entre o nitrito, eritorbato e a_w sobre o *C. sporogenes* e/ou *C. botulinum* proteolítico em produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente.

5. Referências

AOAC (2005). Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Bennett, R. W., Hait, J. M., & Tallent, S. M. (2015). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods (pp. 509-526). American Public Health Association, Washington.

BRASIL. (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2019, seção 1.

BRASIL. (2005). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Adolfo Lutz.

BRASIL. (2000). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.º 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. (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa número 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, indexado ao International Standard Book Number (ISBN). Diário Oficial da União, Brasília, 13 de julho de 2018, seção 1, nº 134, p. 09.

BRASIL. (2020). Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Dados históricos anuais. Ano 2020. <https://portal.inmet.gov.br/dadoshistoricos>. Acessado em 18/03/2021.

Chawla, S. P., & Chander, R. (2004). Microbiological safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology. Food Control, 15(7), 559-563.

Choi, J. H., Bae, S. M., & Jeong, J. Y. (2020). Effects of the addition levels of white kimchi powder and acerola juice powder on the qualities of indirectly cured meat products. Food Science of Animal Resources, 40(4), 636.

- EFSA. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., ... & Lambré, C. (2017). Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *Efsa journal*, 15(6), e04786.
- Gill, C. O., & Jones, S. D. M. (1992). Evaluation of a commercial process for collection and cooling of beef offals by a temperature function integration technique. *International Journal of Food Microbiology*, v.15, p.131 – 143.
- Glass, K. A., & Doyle, M. P. (1991). Relationship between water activity of fresh pasta and toxin production by proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of food protection*, 54(3), 162-165.
- Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat science*, 78(1-2), 68-76.
- Hospital, X. F., Hierro, E., Stringer, S., & Fernández, M. (2016). A study on the toxigenesis by *Clostridium botulinum* in nitrate and nitrite-reduced dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 66-70.
- ICMSF (2011) International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in food 8: Use of data for assessing process control and product acceptance*. Springer, NY.
- Izumi, K., R. G. Cassens, & M. L. Greaser. (1989). Reaction of nitrite with ascorbic acid and its significant role in nitrite-cured food. *Meat Science*. 26:141–153.
- ISO. (1998a). International Organization for Standardization. ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method*, 1° ed. 1998. The International Organization for Standardization, Amendment 1:15/10/2004.
- ISO (1998b). International Organization for Standardization. ISO 15214:1998. *Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic bacteria*, Geneva, Switzerland.
- ISO. (2007). International Organization for Standardization. ISO 6579:2002/Amd 1:2007. *Detection of *Salmonella* spp. in animal feces and in environmental samples from the primary production stage, amendment 1, annex D*. Microbiology

of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 2007.

ISO (2005). International Organization for Standardization. ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – most probable number technique. International Organization for Standardization.

Janganan, T.K; Mullin N.; Tzokov S.B., et al. (2016). Characterization of the spore surface and exosporium proteins of *Clostridium sporogenes*; implications for *Clostridium botulinum* group I strains. Food Microbiology. 59:205-212. doi:10.1016/j.fm.2016.06.003.

Johnson, E. A. (2013). *Clostridium botulinum*. In: Doyle, M.P., Buchanan, R.L. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Whashington, 2013, p.288–304.

King, A. M., Glass, K. A., Milkowski, A. L., Seman, D. L., & Sindelar, J. J. (2016). Modeling the impact of ingoing sodium nitrite, sodium ascorbate, and residual nitrite concentrations on growth parameters of *Listeria monocytogenes* in cooked, cured pork sausage. Journal of food protection, 79(2), 184-193.

Kornacki, J. L. (2001). *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 69-82.

Kolodziejska, I; Skoniecsny, S. & Rubin, L. J. (1990). Malondialdehydenitrite interactions in meat and model systems. Journal of Food Science, Chicago, v. 55, n. 4, p. 925-928, 946.

Krispien, K.; Rödel, W. & Leistner, L. (1979). 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.

Lara, J. A. F., Senigalia, S. W. B., Oliveira, T. C. R. M., Dutra, I. D. S., Pinto, M. F., & Shimokomaki, M. (2003). Evaluation of survival of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* in charqui meats. Meat Science, 65(1), 609-613.

Pettinati, T.D. (1975). Microwave oven method for rapid determination of moisture in meat. Jorunal of AOAC, v. 58, n. 6, p. 1188-1193.

Labbe, R. G. (2015). *Clostridium perfringens*. Chapter 33, p. 403-410. In:

- Mah, J. H., Kang, D. H., & Tang, J. (2008). Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. *International journal of food microbiology*, 128(2), 385-389.
- Majou, D., & Christieans, S. (2018). Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat science*, 145, 273-284.
- Osterbauer, K. J., King, A. M., Seman, D. L., Milkowski, A. L., Glass, K. A., & Sindelar, J. J. (2017). Effects of Nitrite and Erythorbate on *Clostridium perfringens* Growth during Extended Cooling of Cured Ham. *Journal of food protection*, 80(10), 1697-1704.
- Singh, S., & Shalini, R. (2016). Effect of hurdle technology in food preservation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), 641-649.
- Talon, R.; Leroy, S.; Vermassen, A. & Christieans, S. (2015). Réduction des nitrates, nitrites dans les produits carnés: quelles conséquences? Quelles solutions? *Innovations Agronomiques*, 44, 25–34.
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M., & Chirife, J. (2020). Effects of water activity (a_w) on microbial stability as a hurdle in food preservation. *Water activity in foods: Fundamentals and applications*, 323-355.
- Tompkin, R. B., Christiansen, L. N., & Shaparis, A. B. (1978). Antibotulinal role of isoascorbate in cured meat. *Journal of Food Science*, 43(5), 1368-1370.
- Tompkin, R. B., Christiansen, L. N., & Shaparis, A. B. (1979). Iron and the antibotulinal efficacy of nitrite. *Applied and environmental microbiology*, 37(2), 351-353.
- USDA. (1995). United State Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Processing inspectors' calculations handbook. Food Safety and Inspection Service directive 7620.3. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- Woods, L. F. J., Wood, J. M., & Gibbs, P. A. (1981). The involvement of nitric oxide in the inhibition of phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. *Journal of General Microbiology*, 125, 399–406.

CAPÍTULO 3

EFEITO DO SORBATO DE POTÁSSIO NA ESTABILIDADE E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE MORTADELA COMERCIALIZADA EM TEMPERATURA AMBIENTE

Trabalho a ser enviado para "Meat Science"

RESUMO

O estudo das barreiras que conferem estabilidade microbiológica à mortadela comercializada em temperatura ambiente é fundamental para fornecer parâmetros para os órgãos regulatórios e indústria, de forma a assegurar a inocuidade do produto. No presente estudo buscou-se avaliar o efeito da adição de sorbato de potássio e da atividade de água (a_w) sobre *Clostridium sporogenes* PA3679 (*C. sporogenes*), utilizado como surrogate do *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) proteolítico, em mortadela comercializada em temperatura ambiente. Os tratamentos avaliados foram: sem sorbato e a_w 0,960 (S960), com sorbato e a_w 0,960 (C960), sem sorbato e a_w 0,965 (S965) e com sorbato e a_w 0,965 (C965). As atividades de água dos tratamentos S960, S965, C960 e C965 foram de 0,960, 0,966, 0,959 e 0,966, respectivamente. O nitrito apresentou uma depleção ao longo do tempo de estocagem em todos os tratamentos. Os valores de nitrito residual a partir de 15 dias ficaram abaixo dos níveis com efeito do conservante. O sorbato apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a contagem total de mesófilos aeróbios. Aos 90 dias de armazenamento a 25°C, os tratamentos S960 e C960 apresentaram contagens de 1,7 e 3,4 log UFC/g, respectivamente. Já para os tratamentos S965 e C965 as contagens foram de 4,3 e 5,4 log UFC/g. microrganismos. Não foi observado aumento na contagem de *C. sporogenes*, nos tratamentos S960 e C960, com contagens de 2,8 a 3,2 log UFC/g. Contudo, o tratamento S965 apresentou contagem significativamente maior ($p < 0,05$) que o tratamento C965, após 60 dias de estocagem, 5,6 versus 3,1 log UFC/g de *C. sporogenes*. Portanto, os resultados do estudo demonstraram que a a_w e o sorbato apresentam efeito ($p < 0,05$) contra a germinação e crescimento de *C. sporogenes* em mortadela comercializada em temperatura ambiente sob as condições avaliadas.

Palavras-chaves: botulismo, atividade de água, sorbato, segurança de alimentos

1. Introdução

A mortadela comercializada em temperatura ambiente possui no processo de elaboração a adição de sal e aceleradores de cura, condimentos e é submetida à pasteurização. O processo térmico é capaz de eliminar células vegetativas, mas é insuficiente para inativar esporos (Lund & Peck, 2013). Desta forma, o *C. botulinum* do Grupo I proteolítico é considerado o perigo microbiológico mais relevante neste tipo de produto, o qual é armazenado em temperatura que viabiliza o crescimento do microrganismo (Lund & Peck, 2013).

Uma importante barreira contra o *C. botulinum* é a atividade de água. Em produtos que são pasteurizados em embalagens impermeáveis como a mortadela comercializada em temperatura ambiente, a a_w é determinada principalmente pela adição de sal (cloreto de sódio). Segundo Lund & Peck (2013), a a_w mínima para crescimento do patógeno em umectante NaCl e glicerol é de 0,94 e 0,93, respectivamente, e o mínimo de NaCl para prevenir o crescimento de *C. botulinum* proteolítico é de 10% em solução.

Todavia, devido ao aumento considerável de doenças cardiovasculares, como hipertensão (WHO, 2019), há uma preocupação mundial do setor de alimentos para a redução do teor de sódio em alimentos. A *American Heart Association* recomenda que o consumo diário de sódio não deva exceder 1.500 mg (1,5 g) (Appel et al, 2011). Neste sentido, a *Food and Drug Administration* publicou as “Metas de redução voluntária de sódio: Concentrações médias alvo e limite superior para sódio em alimentos comercialmente processados, embalados e preparados; Projeto de Orientação para a Indústria” (FDA, 2016) que propõe iniciativa voluntária por parte das indústrias para redução de sódio nos produtos nos Estados Unidos, assim como na Europa (Europe, 2020).

Uma das alternativas para redução do teor de sódio, sem o comprometimento da segurança microbiológica dos alimentos, é a adição de sorbato como agente antimicrobiano. Este é um ingrediente listado como GRAS que apresenta efeito inibitório sobre bolores, leveduras e algumas bactérias (Ivey et al., 1978; Sofos et al., 1979). Em mortadela, o uso do sorbato isoladamente ou em combinação com o nitrito foi avaliado (Al-Shuibi & Al-Abdullah, 2002). O

estudo demonstrou que o sorbato utilizado isoladamente (como substituto total do nitrito) não é sensorialmente aceito e apresenta altos valores de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), ou seja, alta oxidação lipídica. Entretanto, quando utilizado em combinação com o nitrito não apresenta diferença significativa em relação à cor, sabor e aceitação global em comparação ao uso exclusivo de nitrito.

Salsichas pré-cozidas e não curadas com e sem sorbato de potássio (0,1% p/p) foram inoculadas com *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *C. perfringens* e *C. botulinum*, e mantidas a 27°C para simular uma temperatura de abuso para o produto (Tompkin et al, 1974). O estudo demonstrou que crescimento de *Salmonella* foi impactado pela presença de sorbato. Já o crescimento de *S. aureus* foi impactado apenas em um dia na presença de sorbato. O *C. perfringens* declinou abaixo dos níveis detectáveis no primeiro dia, independente da presença ou não do composto. O sorbato impactou o crescimento de *C. botulinum*, a toxina botulínica foi detectada após quatro dias no produto sem o aditivo e após dez dias no produto como o aditivo (Tompkin et al, 1974).

Outro estudo avaliou a combinação do efeito do NaCl (0-4% m/v), do sorbato de potássio (0-4% p/v) e da nisina (0-300 ppm) em dois diferentes valores de pH (5,5 e 7), frente a germinação de esporos de *C. sporogenes*, utilizado como *surrogate* do *C. botulinum* em caldo nutriente (Khanipour et al, 2016). Os resultados indicaram que o sal, o sorbato de potássio e a nisina apresentaram um efeito inibitório significativo sobre o *C. sporogenes* em alta umidade (>95%) e valores de pH acima de 4,5. As combinações dos conservantes selecionados foram mais eficazes do que qualquer um deles utilizados individualmente, além disso, o efeito inibitório foi dependente do pH (Khanipour et al, 2016).

Portanto, para atender aos acordos mundiais de redução de sódio os setores produtivos precisam de alternativas que não coloquem em risco a segurança microbiológica dos produtos cárneos. O sorbato seria uma opção, entretanto, é necessário entender o impacto deste aditivo na segurança microbiológica em alimentos com diferentes a_w , uma vez que este é um dos

principais parâmetros a serem controlados frente ao *C. botulinum* proteolítico. O objetivo deste estudo foi avaliar a adição de sorbato de potássio (0,25%) e diferentes a_w (0,960 e 0,965) sobre o desenvolvimento de *C. sporogenes* PA3679 em mortadela comercializada em temperatura ambiente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo do inóculo e inoculação das amostras

A cepa *C. sporogenes* PA3679 (ATCC 7955) foi utilizada como *surrogate* de *C. botulinum* do Grupo I (Janganan et al., 2016), a mesma foi obtida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A manutenção da cultura foi realizada em *Cooked Meat Medium* (Acumedia, Neogen, Lansing, EUA) a 4°C.

O preparo da solução de esporos foi realizado conforme Mah et al. (2008). A solução de esporos de *C. sporogenes* foi preparada inoculando-se 1 µL da cultura ativa em 10 mL de caldo TPGY (trypticase peptone-glucose yeast extract broth) (50 g tryptone (Acumedia), 20 g bacto yeast extract (Difco, Sparks, EUA), 5 g peptone (Acumedia), 6 g dextrose (C₆H₁₂O₆, Êxodo, Brasil) e 1 g tioglicolato de sódio (C₂H₃NaO₂S, Vetec Química, Brasil), em 1 litro de água destilada). Em seguida, foi realizada incubação em anaerobiose a 32°C por 2 dias.

Após a incubação, foi transferida uma alíquota de 1 mL do cultivo para 100 mL de caldo TPGY, seguido de nova incubação. Então, uma alíquota de 10 mL deste cultivo foi transferida para 1 litro de caldo TPGY e esse foi incubado nas mesmas condições anteriores. Após esta última incubação, a cultura foi centrifugada a 14.000 rpm, a 4°C, por 10 min, seguida por três lavagens sucessivas em solução salina a 0,85%. O precipitado foi ressuspenso em 100 mL do meio para esporulação [60 g triptona (Acumedia), 1 g dextrose (Êxodo) e 1 g de tioglicolato de sódio (Vetec Química) suplementado com 5 g calcium carbonate (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em 1 L de água destilada, pH 5,0].

Em seguida, todo esse volume foi incorporado a 900 mL de meio de esporulação e incubado sob anaerobiose a 32°C por 10 dias. Então, foi realizada outra centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente e o precipitado obtido foi ressuspenso em 100 mL de solução tampão [5.675 g

fosfato de sódio (Na_2HPO_4 , Êxodo) e 3,63 g fosfato de potássio (K_2HPO_4 , Êxodo) em 1L de água destilada, pH 7,0]. A metodologia utilizada para a contagem dos esporos presentes na suspensão do inóculo está descrita no item 2.3, a concentração final de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 foi de aproximadamente 10^5 esporos/mL.

2.2 Processamento das amostras de mortadela

Foram elaborados quatro tratamentos: 1) C960: com sorbato e a_w 0,960. 2) S960: sem sorbato e a_w 0,960. 3) C965: com sorbato e a_w 0,965 e 4) S965: sem sorbato e a_w 0,965.

As emulsões de mortadela foram elaboradas conforme os procedimentos descritos a seguir: a carne crua congelada foi repartida e moída (Hermann, 106, São Paulo, Brasil) em discos de 12 mm, transferida para o cortador (Kramer & Grebe Karl Ernst Zippel, Biedenkopt-Wallau, Alemanha) e homogeneizada. Uma amostra foi retirada para análise de esporos de clostrídio sulfito redutor (Item 2.2.3) para garantir que na matéria prima não havia presença de esporos de *Clostridium* spp. Então, foi realizada a inoculação de 1 mL da suspensão de esporos de *C. sporogenes* PA3679 por quilo de emulsão. Em seguida, foram adicionados os demais ingredientes que constam na Tabela 1. A emulsão foi homogeneizada no cortador até atingir 10-12°C.

Para obtenção dos quatro tratamentos, a emulsão foi dividida da seguinte forma:

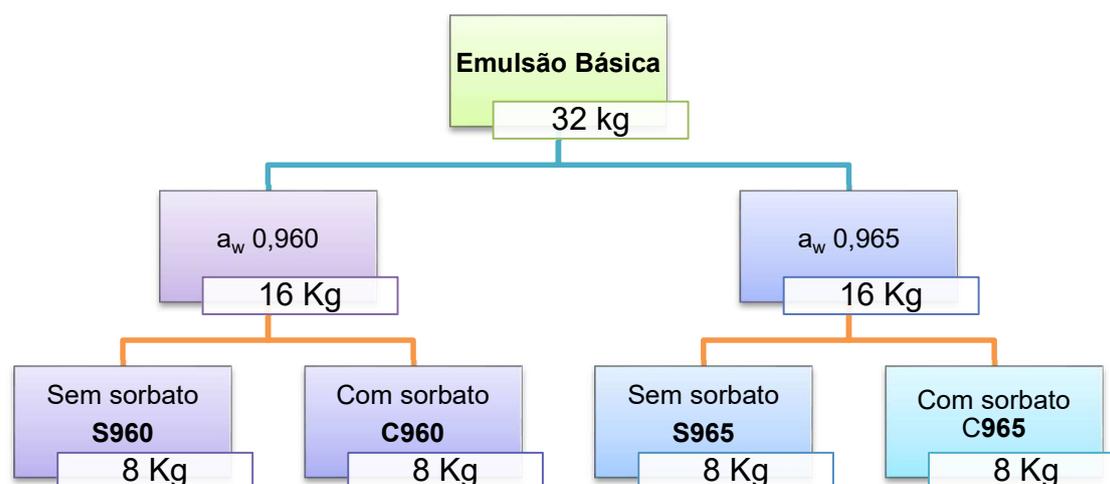


Figura 1. Fluxograma de obtenção dos quatro tratamentos.

A umidade da emulsão foi determinada por metodologia rápida (Pettinati, 1975) para possibilitar os cálculos de ajuste de a_w , conforme cada tratamento. Foi utilizada a equação de Krispien, Rodel e Leistner (1979), modificada para ajuste da a_w :

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

onde: CS = Concentração salina no produto (%NaCl / %NaCl + % Umidade)

Foram adicionadas as quantidades calculadas de NaCl em cada um dos tratamentos para ajuste de a_w de 0,960 e 0,965, 0,25% de sorbato nos tratamentos correspondentes, nitrito e eritorbato em todos os tratamentos (Figura 1). Após a homogeneização da emulsão, a mesma foi embutida em tripa plástica impermeável (taxa de permeabilidade ao oxigênio – TPO₂ de 19.14 mL/m/dia). O regime de cozimento foi de 85°C com vapor direto em estufa (HR 1, Schröter, Borgholzhausen, Alemanha), até que o interior do produto atingisse 75°C. Após cozimento, o produto foi mantido por 15 min em água corrente, a temperatura ambiente.

As amostras foram estocadas em câmaras a 25±1°C. As análises de composição centesimal, a_w e caracterização microbiológica (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., estafilococos coagulase positivo, *Escherichia coli* e clostrídio sulfito redutor a 46°C) foram realizadas 1 dia após o processamento. O estudo de vida útil foi realizado em duas repetições de processamento. Dentro de cada repetição foram amostradas 3 unidades experimentais, cada uma com 90 ± 5 g, totalizando 6 amostras (n=6). Cada uma das seguintes análises foi realizada em triplicata nos dias 1, 15, 30, 60 e 90: nitrito, nitrato, pH, contagem de mesófilos aeróbios totais, clostrídio sulfito redutor com e sem choque (esporos e células vegetativas), bactérias lácticas e enterobactérias.

Tabela 1. Composição da “emulsão básica”.

Ingredientes	Quantidade (%)
CMS	60,00
Gel pele suína (2:1)	12,00
Fígado suíno	1,00
Rim	1,00
Carne suína	16,25
Proteína texturizada de soja (Centex 4010, Solae, Brasil)	3,50
Fécula de mandioca (Tipo I, Pinduca, Brasil)	5,00
Açúcar (União, Brasil)	0,60
Tripolifosfato de sódio (Brifisol 550, ICL, Brasil)	0,35
Pirofosfato ácido de sódio (Fibrisol 414, ICL, Brasil)	0,15
Sal cura (90% NaCl / 10% nitrito de sódio) (Pó Hungaro V, Kraki, Brasil)	0,15
Total	100

2.3 Análises microbiológicas

A contagem de esporos e células vegetativas de *C. sporogenes* foi realizada na suspensão de esporos, na matéria prima cárnea e nas amostras inoculadas ao longo da estocagem (Labbe, 2015). Amostras de 25 g foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada a 0,1% (Acumedia). Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas e plaqueamento em profundidade em SFP agar (Difco, Sparks, EUA), com incubação em anaerobiose a 37°C por 48 h. Para contagem de esporos, as mesmas diluições foram submetidas a choque térmico a 80°C por 12 min em banho-maria, seguido por banho de gelo por 5 min. Após esse procedimento, foi feito plaqueamento e incubação, conforme descrito anteriormente. O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mL (suspensão de esporos) (UFC/mL) ou g (matéria primas cárnea e amostras inoculadas da segunda etapa) (UFC/g).

As contagens de microrganismos anaeróbios mesófilos foram realizadas de acordo com Ryser e Schuman (2015), bactérias lácticas segundo a ISO 15214 (1998b) e enterobactérias de acordo com Kornacki et al. (2015). Os resultados foram expressos em log UFC/g.

Outras análises foram realizadas na mortadela cozida no dia 1: *Escherichia coli* (ISO 7251, 2005); *Salmonella* sp. (ISO 6579:2002); estafilococcus coagulase-positivo (Bennett et al., 2015) e *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2, 1998a).

2.4 Análises físico-químicas

Para as análises físico-químicas foram amostradas duas peças (duplicata de amostra) de cada tratamento por tempo em cada uma das duas repetições de processamento (n=4).

A composição centesimal foi determinada de acordo com a AOAC (2005), proteínas foram avaliadas de acordo com o método 981.10, umidade de acordo com o método 985.14, cinzas de acordo com o método 920.153 e lipídeos totais de acordo com o método 991.36, os carboidratos foram determinados por titulação conforme determinado por Brasil (2018). A atividade de água foi determinada no produto final utilizando o analisador Aqualab 4TE (Decagon Devices, EUA) a $25,0 \pm 0,3$ °C.

O pH foi determinado utilizando pHmetro (Digimed modelo DM21, Brasil) com eletrodo de perfuração (Digimed, Brasil). O teor de nitrito (mg/kg) foi determinado espectrofotometricamente (Brasil, 2005), assim a absorbância foi medida a 540 nm e a concentração de nitrito foi calculada de acordo com a equação obtida pela leitura da curva analítica, usando solução padrão de nitrito de sódio (concentração).

2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias dos tratamentos ($p < 0,05$). A análise estatística incluiu os tratamentos e o tempo de armazenamento como efeitos

fixos. Valores médios e erro padrão das médias foram relatados. Os dados foram analisados usando SAS (V.9.1 SAS Inst. Inc., Cary, NC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal das amostras foi de $63,1 \pm 3,1$ g/100g de umidade, $12,9 \pm 1,2$ g/100g de proteína, $12,3 \pm 2,0$ g/100g de gordura, $6,9 \pm 1,2$ g/100g de carboidrato e $4,9 \pm 0,1$ g/100g de cinzas. As atividades de água determinadas nos tratamentos S960, S965, C960 e C965 foram de $0,960 \pm 0,002$, $0,966 \pm 0,002$, $0,959 \pm 0,002$ e $0,966 \pm 0,002$, respectivamente.

As médias dos valores de pH ao longo da estocagem variaram de 5,9 a 6,3. Tal medida foi realizada para controle deste parâmetro que poderia influenciar no crescimento do *C. sporogenes*, porém, não houve influência do pH nos resultados do teste desafio ($p < 0,05$). O pH mínimo para crescimento de *C. botulinum* proteolítico é de 4,6 (Lund & Peck, 2013).

O nitrito apresentou uma depleção ao longo do tempo em todos os tratamentos (Tabela 2). Observa-se significativa redução entre o 1º e o 15º dia de estocagem ($p < 0,05$). A partir do 30º dia não foi verificada influência significativa do tempo no teor de nitrito ($p > 0,05$). Em relação à análise de comparação entre os tratamentos dentro de cada tempo de estocagem, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos após 1 dia de processamento.

Tabela 2. Concentração de nitrito (ppm) em mortadelas estocadas a 25°C.

Tempo (dias)	Nitrito (ppm)				Valor p	Valor p Sorbato	Valor p a_w
	$a_w = 0,960$		$a_w = 0,965$				
	Com Sorbato	Sem Sorbato	Com Sorbato	Sem Sorbato			
1	78,3±2,1 Aa	76,9±1,0 Aa	87,0±11,1 Aa	85,9±12,2 Aa	0,1111	0,7404	0,0130
15	17,1±2,0 Bb	13,4±2,7 Bb	26,0±7,3 Ba	9,5±5,0 Bb	<0,0001	0,0003	0,4400
30	9,0±2,0 Ca	6,5±0,7 Cab	7,4±2,4 Cab	4,9±1,2 Bb	0,0050	0,0039	0,0674
60	8,3±2,5 Ca	5,7±1,7 Cb	4,6±0,2 Cb	3,8±0,4 Bb	0,004	0,0623	0,0010
90	8,7±3,1 Ca	4,8±1,3 Cb	3,8±1,1 Cb	3,3±1,1 Bb	0,0002	0,0482	0,0023
Valor de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	-	-	-

Valores correspondem a média ± desvio-padrão. Letras minúsculas diferentes na linha apresentam diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na coluna apresentam diferença entre os tempos ($p < 0,05$).

As análises microbiológicas realizadas no 1º dia após processamento indicaram que as amostras estavam de acordo com a Instrução Normativa nº60 da ANVISA (Brasil, 2019). A contagem de *E. coli* foi <3,0 NMP/g, estafilococcus coagulase positiva <1,0 log UFC/g, *Salmonella sp.* ausente em 25 g, *Listeria monocytogenes* <1,0 log UFC/g e clostrídio sulfito redutor a 46°C <1,0 log UFC/g.

O estudo da estabilidade microbiológica ao longo de 90 dias apresentou contagens abaixo do limite de detecção (<1,0 log UFC/g) para bactérias lácticas e enterobactérias. Em relação à contagem total de mesófilos aeróbios, todos os tratamentos apresentaram crescimento significativo ao longo do tempo ($p < 0,05$), com exceção do tratamento com sorbato e a_w 0,960 (C960). Na comparação entre os tratamentos dentro de cada tempo, observa-se que nos primeiros 15 dias não houve diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), nos quais as contagens variaram de 1,0 a 1,3 log UFC/g.

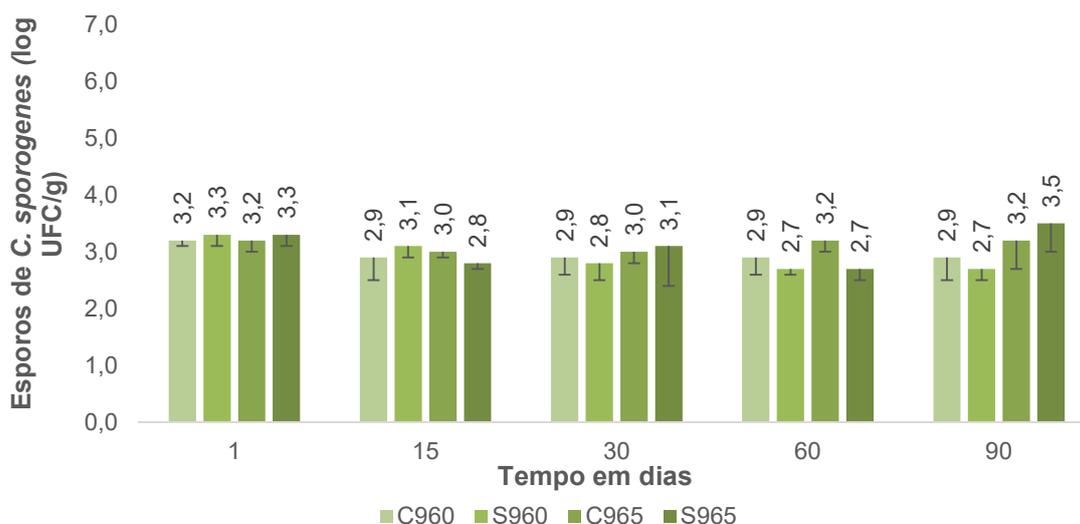
Porém, nos dias 30 e 60 foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem de mesófilos aeróbios totais entre os tratamentos C960 e S960, e C965 e S965, respectivamente. Após 90 dias de estocagem, foi verificada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos C960 e C965. Deste modo, pode-se inferir que sorbato e a_w apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento de microrganismos mesófilos aeróbios totais, tal efeito não foi detectado no início da vida útil, no período intermediário houve maior efeito do sorbato e no final da estocagem observou-se o efeito preponderante da a_w (Tabela 4).

Tabela 4. Contagem total de mesófilos aeróbios (log UFC/g) ao longo da estocagem de mortadelas em temperatura ambiente (25°C).

Tempo (dias)	$a_w = 0,960$		$a_w = 0,965$		Valor p	Valor p Sorbato	Valor p a_w
	C960	S960	C965	S965			
1	1,1±0,2 Aa	1,2±0,3 Ba	1,2±0,2 Ba	1,2±0,2 Ca	0,8622	0,4466	0,9140
15	1,0±0,0 Aa	1,3±0,4 Ba	1,3±0,3 Ba	1,3±0,4 Ca	0,3341	0,2896	0,4246
30	1,8±0,9 Ab	4,5±1,4 Aa	1,6±1,3 Bb	2,8±1,6 Bab	0,0047	0,0026	0,1896
60	2,0±1,6 Ab	2,8±1,9 ABab	2,0±0,7 Bb	4,4±0,3 Aa	0,0122	0,0090	0,1998
90	1,7±0,9 Ab	3,4±1,8 ABab	4,3±0,9 Aa	5,4±1,0 Aa	0,0005	0,0576	0,0007
Valor p	0,2603	0,0012	<0,0001	<0,0001	-	-	-

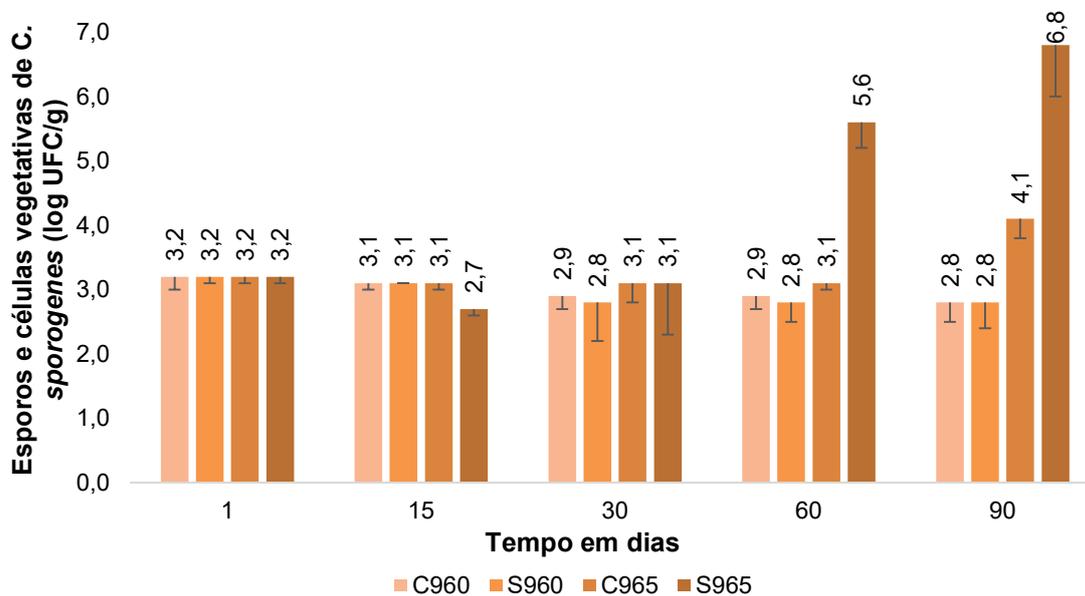
O limite de detecção foi de 1 log UFC/g. Letras minúsculas diferentes na linha apresentam diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na coluna apresentam diferença entre os tempos ($p < 0,05$). C960: com sorbato e a_w 0,960. S960: sem sorbato e a_w 0,960. C965: com sorbato e a_w 0,965 e S965: sem sorbato e a_w 0,965.

A contagem de esporos de *C. sporogenes* e de células vegetativas mais esporos de *C. sporogenes* são apresentadas nas Figuras 2 e 3, respectivamente. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na contagem de esporos ao longo do período de estocagem (Figura 2). Destaca-se que aos 90 dias a a_w apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a contagem de esporos, porém o mesmo não foi observado para o sorbato ($p > 0,05$). Os tratamentos com a_w 0,965 apresentaram uma média de contagem de esporos maior que os tratamentos com a_w 0,960. A partir desses resultados pode-se inferir que a a_w apresenta efeito sobre a germinação de esporos de *C. sporogenes* em mortadelas comercializadas em temperatura ambiente.



C960: com sorbato; S960: sem sorbato; C965: com sorbato; S965: sem sorbato e a_w 0,965.

Figura 2. Contagem total de esporos de *C. sporogenes* ao longo da estocagem de mortadelas em temperatura ambiente (26°C). Limite de detecção: 1 log UFC/g.



C960: com sorbato; S960: sem sorbato; C965: com sorbato; S965: sem sorbato e a_w 0,965.

Figura 3. Contagem total de esporos e células vegetativas de *C. sporogenes* ao longo da estocagem de mortadelas em temperatura ambiente (25±1°C). O limite de detecção foi de 1 log UFC/g.

Nenhum dos tratamentos apresentou crescimento de células vegetativas até 30 dias de armazenamento ($p>0,05$) (Figura 3). Os tratamentos com a_w menor (C960 e S960) não apresentaram aumento de contagem de células vegetativas de *C. sporogenes* ao longo dos 90 dias ($p>0,05$). Por outro lado, o tratamento menos desafiador ao crescimento de microrganismos, ou seja, com maior a_w (0,965) e sem sorbato, S965, apresentou crescimento significativo ($p<0,05$) de células vegetativas a partir de 60 dias de estocagem, atingindo 6,8 log UFC/g aos 90 dias de estocagem. O efeito do sorbato foi evidenciado quando comparados os tratamentos C965 e S965, nos quais a diferença na contagem de células vegetativas de *C. sporogenes* foi de 2,5 e 2,7 log UFC/g após 60 e 90 dias, respectivamente, o que reflete o impacto deste aditivo na prevenção da germinação de esporos durante o período de 90 dias. Por outro lado, foi demonstrado por Molognoni, Daguer, Merlo e Lindner (2019) que há formação de compostos carcinogênicos (ENA-ácido etil nítrico e DNMP-2 metil 1,4 dinitro pirrol) quando sorbato é utilizado juntamente com nitrito em produtos cárneos cozidos, o que comprometeria seu uso em produtos adicionados de nitrito sob o aspecto toxicológico.

Embora seja geralmente aceito que condições que suportam a germinação de esporos e o crescimento das células vegetativas também propiciam a produção de toxinas, não há consenso sobre as populações mínimas de *C. botulinum* necessárias para a produção de neurotoxinas (Glass & Marshall, 2013). Vários estudos correlacionaram a produção de toxinas detectáveis com contagem de célula vegetativa de 4 a 5 log UFC/g (Carlin & Peck, 1996; Ikawa, 1991). Entretanto, outros estudos demonstraram que a produção de neurotoxina botulínica pode ser detectada quando as populações aumentam não mais que 1 ciclo logaritmo ou antes de qualquer aumento na contagem de placas (Austin, 1998; Larson, 2002). Portanto, de acordo com os resultados deste estudo, pode-se considerar que o ajuste da a_w em produtos cárneos comercializados em temperatura ambiente é de suma importância para impedir a germinação de esporos de *C. botulinum* e conseqüentemente a possível produção de neurotoxinas. Entretanto, o uso do sorbato na formulação de mortadela comercializada em temperatura ambiente e com a_w superior a 0,960 assume

papel importante como barreira para inibir a germinação e crescimento de células vegetativas de clostrídios proteolíticos, garantindo assim a segurança do produto final.

4. CONCLUSÕES

Os resultados evidenciaram que a_w e sorbato impactaram positivamente na segurança microbiológica de mortadela comercializada em temperatura ambiente, pois preveniram o crescimento e a germinação de esporos de *C. sporogenes* PA3679. Visando a segurança de alimentos como um todo, recomenda-se que outros estudos sejam conduzidos para que seja avaliada a segurança toxicológica do uso combinado do sorbato de potássio com o nitrito de sódio nesta categoria de produto.

6. REFERÊNCIAS

- Al-Shuibi, A. M., & Al-Abdullah, B. M. (2002). Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of mortadella. *Meat Science*, 62(4), 473-478.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- Appel, L. J., Frohlich, E. D., Hall, J. E., Pearson, T. A., Sacco, R. L., Seals, D. R., et al. (2011). The importance of population-wide sodium reduction as a means to prevent cardiovascular disease and stroke: a call to action from the American Heart Association. *Circulation*, 123(10):1138–43.
- Austin, J. W., Dodds, K. L., Blanchfield, B., & Farber, J. M. (1998). Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* on inoculated fresh-cut packaged vegetables. *J Food Prot.* 61:324–8.
- Bennett, R. W., Hait, J. M., & Tallent, S. M. (2015). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods (pp. 509-526). American Public Health Association, Washington.
- BRASIL. (2005). Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos.
- BRASIL. (2019). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões

microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2019, seção 1.

BRASIL. (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa número 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, indexado ao International Standard Book Number (ISBN). Diário Oficial da União, Brasília, 13 de julho de 2018, seção 1, nº 134, p. 09.

Carlin, F., & Peck M. W. (1996). Growth of and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in cooked pureed vegetables at refrigeration temperatures. *Appl Environ Microbiol*; 62:3069–72.

EUROPE. (2020). Dietary salt/sodium. Disponível em: <https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/salt>. Acessado em: 23 de set de 2020.

FDA. Food and Drug Administration. (2016). Voluntary Sodium Reduction Goals: Target Mean and Upper Bound Concentrations for Sodium in Commercially Processed, Packaged, and Prepared Foods: Guidance for Industry.

Glass, K., & Marshall, K. (2013). *Clostridium botulinum*. In *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 371-387). Academic Press.

Ikawa, J. Y. (1991). *Clostridium botulinum* growth and toxigenesis in shelf-stable noodles. *J Food Sci*. 56:264–5.

ISO. (1998a). International Organization for Standardization. ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method, 1º ed. 1998. The International Organization for Standardization, Amendment 1:15/10/2004, 1998.

ISO (1998b). International Organization for Standardization. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic bacteria, Geneva, Switzerland.

ISO. (2007). International Organization for Standardization. ISO 6579:2002/Amd 1:2007. Detection of *Salmonella* spp. in animal feces and in environmental samples from the primary production stage, amendment 1, annex D. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp..

- ISO. (2005). International Organization for Standardization. ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – most probable number technique. International Organization for Standardization.
- Ivey, F. J., Shaver, K. J., Christiansen, L. N., & Tompkin, R. B. (1978). Effect of potassium sorbate on toxinogenesis by *Clostridium botulinum* in cured meat: a review. *Journal of Food Protection*, 42(9), p.621–625.
- Janganan, T.K; Mullin N.; Tzokov S.B., et al. (2016). Characterization of the spore surface and exosporium proteins of *Clostridium sporogenes*; implications for *Clostridium botulinum* group I strains. *Food Microbiology*. 59:205-212. doi:10.1016/j.fm.2016.06.003.
- Khanipour, E., Flint, S. H., McCarthy, O. J., Golding, M., Palmer, J., Ratkowsky, D. A., ... & Tamplin, M. (2016). Modelling the combined effects of salt, sorbic acid and nisin on the probability of growth of *Clostridium sporogenes* in a controlled environment (nutrient broth). *Food Control*, 62, 32-43.
- Kornacki, J. L., Gurtler, J. B., & Stawick, B. A. (2015). Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. (Eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, 995p.
- Krispien, K.; Rödel, W. & Leistner, L. (1979). 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.
- Labbe, R. G. (2015). *Clostridium perfringens*. Chapter 33, p. 403-410. In: Larson AE. (2002). Comparison of methods to evaluate the botulinal safety of foods. University of Wisconsin-Madison. Unpublished master's thesis.
- Lund, B. M., & Peck, M. W. (2013). *Clostridium botulinum*. Guide to foodborne pathogens, 2nd ed. Oxford: John Wiley & Sons, 91-111.
- Mah, J. H., Kang, D. H. & Tang, J. (2008). Morphological study of heat-sensitive and heat-resistant spores of *Clostridium sporogenes*, using transmission electron microscopy. *Journal of Food Protection*, v.71, n.0, p.953–958.
- Molognoni, L., Daguer, H., Motta, G. E., Merlo, T. C., & Lindner, J. D. D. (2019). Interactions of preservatives in meat processing: Formation of carcinogenic

compounds, analytical methods, and inhibitory agents. *Food Research International*, 125, 108608.

Pettinate, J.D. (1975). Microwave oven for rapid determination of moisture in meat. *Journal of the AOAC*. Vol. 58, n°6, p.1188-1193.

Ryser, E., & Schuman, J.D. (2015). Mesophilic aerobic plate count. In Salfinger, Y., Tortorello, M. L. (Eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 995). American Public Health Association, Washington.

Sofos, J. N., Busta, F. F., & Allen, C. E. (1979). Botulism control by nitrite and sorbate in cured meat: A review. *Journal of Food Protection*, Vol 42, n.9, p.739-770.

Tompkin, R. B., Christiansen, L. N., Shaparis, A. B., & Bolin, H. (1974). Effect of potassium sorbate on *salmonellae*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, and *Clostridium botulinum* in cooked, uncured sausage. *Applied microbiology*, 28(2), 262-264.

WHO. (2019). World Health Organization. Reducing sodium intake to reduce blood pressure and risk of cardiovascular diseases in adults. Disponível em: https://www.who.int/elena/titles/sodium_cvd_adults/en/. Acessado em: 15 de julho de 2020.

CAPÍTULO 4

**EFEITO DA SUBSTITUIÇÃO DE CLORETO DE SÓDIO POR CLORETO DE
POTÁSSIO NA ESTABILIDADE E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DE
MORTADELA COMERCIALIZADA EM TEMPERATURA AMBIENTE FRENTE
AO Clostridium sporogenes PA 3679**

Trabalho a ser enviado para “Food science and technology international”

RESUMO

A redução de sódio em produtos cárneos é uma realidade. Porém, o efeito dos substitutos do NaCl sobre os patógenos ainda deve ser alvo de investigação. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da substituição de cloreto de sódio (NaCl) por cloreto de potássio (KCl) sobre *Clostridium sporogenes* PA3679 (*C. sporogenes*), usado como *surrogate* de *Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) em mortadela comercializada em temperatura ambiente. As atividades de água (a_w) alvos dos produtos foram 0,95, 0,96 e 0,97, tanto para formulação com NaCl quanto para KCl. As amostras foram avaliadas após 1, 15 e 30 dias de estocagem a 35°C. Quanto maior a a_w , menor foi o efeito sobre a germinação de *C. sporogenes* ($p < 0,05$). Após 15 dias de estocagem os produtos contendo exclusivamente NaCl nas a_w de 0,95, 0,96 e 0,97 apresentaram, respectivamente, $2,6 \pm 0,2$ log UFC/g, $2,7 \pm 0,2$ log UFC/g e $7,5 \pm 0,5$ log UFC/g de contagem de esporos de *C. sporogenes*. Os produtos com KCl nas mesmas faixas de a_w (0,95, 0,96 e 0,97) apresentaram, respectivamente, $2,9 \pm 0,5$ log UFC/g, $6,1 \pm 0,3$ log UFC/g e $7,5 \pm 0,2$ log UFC/g de contagem de esporos de *C. sporogenes*. Porém, o sal também apresentou efeito sobre a germinação, o NaCl apresentou uma inibição mais significativa em relação ao KCl. A realização de teste desafio com *C. sporogenes* como *surrogate* do *C. botulinum* em mortadelas comercializadas em temperatura ambiente demonstrou que o KCl pode não ter um efeito antimicrobiano equivalente neste microrganismo mesmo que a adição seja na mesma concentração molar de cloreto de sódio.

Palavras-chave: botulismo, cloreto de potássio, emulsão de carne, segurança dos alimentos.

1. INTRODUÇÃO

O botulismo é uma doença rara, de alta severidade, vinculada também por produtos cárneos prontos para consumo e causada por neurotoxinas produzidas por *C. botulinum* (Bhattacharjee et al., 2016; WHO, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018), o botulismo apresenta um potencial de surto alto a moderado se transmitido por alimentos. No Marrocos, Ouagari et al (2002) reportaram um surto de botulismo envolvendo mortadela, totalizando 70 casos e 20 óbitos. No Brasil foram registrados 83 casos de botulismo entre 1999 e 2014. Dos casos confirmados, 55% foram relacionados à mortadela (Brasil, 2014). O *C. botulinum* proteolítico pode formar neurotoxinas do tipo A, B e F, apresenta como parâmetros de crescimento temperatura ótima de 37°C, temperatura mínima de 10 a 12°C, pH mínimo de 4,6, concentração de NaCl de 10%, atividade de água mínima em NaCl/glicerol de 0,94/0,93, além de resistência térmica do esporo de $D_{121^{\circ}\text{C}}=0,21\text{min}$ (Glass & Marshall, 2013).

O *C. sporogenes* PA 3679 tem sido largamente usado como um *surrogate* não neurotoxigênico para o *C. botulinum* proteolítico em validações de processo térmico em alimentos com baixa acidez e comercializados em temperatura ambiente (Savani et al, 1978, Molins et al, 1985, Zhu et al, 2008, Hong et al., 2016, Adhikari et al, 2018). O uso de *surrogate* é fundamentado pelas demonstrações de que o PA 3679 está mais estreitamente relacionado geneticamente com várias cepas do *C. botulinum* proteolítico do que outras linhagens de *C. sporogenes*, incluindo 213, J-53 e NCIMB (Nakamura et al., 1977; Sebahia et al., 2007; Wu et al., 1972).

Em alimentos processados termicamente, os esporos resistentes ao calor podem sobreviver e são capazes de germinar em condições favoráveis (El Jaam et al., 2017). A germinação dos esporos de *C. botulinum* e consequente produção de toxina dependem, entre outros fatores, da atividade de água. Em embutidos cárneos o ajuste da a_w é realizado principalmente pelo uso de NaCl (Leistner, 2000). Porém, existe uma tendência mundial de redução do teor de sódio nesse tipo de produto (Scalfaro et al., 2018). Em 2012, a WHO recomendou fortemente a diminuição de ingestão de sódio para reduzir as doenças de pressão arterial e cardíacas, enfartos e doenças coronárias em

adultos e controle de pressão arterial em crianças (WHO, 2012). A “*Dietary Guidelines for Americans*” defendia que de 2015 a 2020 os consumidores limitassem a ingestão diária de sódio a menos de 2.300 mg (USDA, 2015).

Uma das alternativas empregadas para esse fim é a substituição parcial de NaCl por KCl. O cloreto de potássio é regulamentado pelo Regulamento (EC) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu, o qual estabelece que o cloreto de potássio pode ser adicionado “*quantum satis*” aos alimentos, ou seja, a quantidade necessária para exercer sua função, mas não mais que o necessário (EC, 2008). Todavia, o KCl contribui de forma menos efetiva para o aumento da força iônica (Ruusunen e Puolanne, 2005), isto porque a massa molar (g/mol) do NaCl é 58,5, enquanto a massa molar do KCl é 74,5. Deste modo, a substituição utilizando a mesma massa de NaCl por KCl reduz a concentração de íons e a a_w com efeitos negativos na conservação de alimentos (Frølich et al., 2014). Tal diminuição da a_w também interfere na segurança microbiológica de produtos cárneos elaborados com substituição parcial de NaCl por KCl, quando a a_w é uma barreira de alto impacto. Por este motivo, estudos que comparem o efeito de diferentes sais sobre microrganismos devem calcular concentração na mesma base molar.

Neste sentido, Barbut et al (1986) investigaram o efeito de diferentes sais (NaCl, KCl e $MgCl_2$) sobre a produção de neurotoxina botulínica em salsicha de peru. Os autores concluíram que o aumento da força iônica retardou a germinação e produção de toxina. Golden et al (2017), avaliaram o impacto da composição de produtos (à base de carne, vegetais ou carboidratos) e da temperatura de estocagem na inibição da formação de toxina botulínica. Os autores não observaram a produção de toxina a 25°C por 48 h, por outro lado, em 72 h todos os tratamentos apresentaram toxina. As amostras que foram submetidas à temperatura de abuso de 25°C por 12 h e depois foram armazenadas a 12,5°C por 6 e 12 semanas apresentaram deterioração e formação de toxina botulínica dependentes do pH e tempo de armazenamento, os autores destacam o impacto da microflora endógena na segurança e na interpretação de estudos de testes desafios (Golden et al., 2017).

As mudanças nas preferências dos consumidores por alimentos minimamente processados, com características de baixo sódio e livres de

aditivos químicos tem modificado o risco de botulismo em alimentos de baixa acidez (Scalfaro et al., 2018), especialmente quando expostos a temperaturas de abuso (Golden et al., 2017). Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da a_w (0,95, 0,96 e 0,97) ajustada com diferentes sais (NaCl e KCl) sobre *C. sporogenes* PA3679, usado como substituto do *C. botulinum*, em mortadelas comercializadas em temperatura de abuso (35°C).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ajuste de atividade de água em sistema modelo de emulsão cárnea

A realização dessa etapa iniciou-se com a elaboração de uma emulsão cárnea constituída por 60% CMS (Carne Mecanicamente Separada) (BRF Foods, Brasil), 12% gel de pele de porco cru (4:1, BRF Foods, Brasil), 19,5% carne de porco, 3,5% proteína texturizada de soja (Centex 4010, DuPont, Wilmington, Estados Unidos) e 5% de amido de mandioca (Tipo I, Pinduca, Brasil). A CMS, o gel de pele de porco e a carne suína (mantida a -17 °C) foram moídos (106, Hermann, Brasil), usando placa de 12 mm plate a fim de se obter uma emulsão cárnea em um mini-cortador (Skymesen, Brasil). Então, a proteína de soja e o amido foram adicionados e cominuídos por 1 min.

A umidade da emulsão foi determinada por método rápido por micro-ondas (Brastemp, Brasil), segundo Pettinate (1985). O valor obtido para a massa crua foi de 58,97%. Os cálculos de ajuste da atividade de água (0,93 - 0,97) foram realizados segundo Krispien, Roedel e Leistner (1979), conforme a Equação 1.

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

Onde: CS é Concentração salina no produto. [%NaCl / (%NaCl + % Umidade)] ou [%KCl / (%KCl + % Umidade)]

A partir dos cálculos determinou-se as porcentagens de sais (NaCl e KCl) a serem adicionadas em cada um dos tratamento, como na Tabela 1. Amostras de 45 ± 5 g das emulsões cruas foram colocadas em embalagens de polietileno

(impermeável com taxa de permeabilidade de oxigênio de 97,45 mL (CNTP). m-2.dia-1), seladas a vácuo e cozidas por 1 hora em água a 70 °C.

As a_w das emulsões (cruas e cozidas) foram aferidas em triplicata, utilizando o analisador Aqualab 4TE (METER Group, Pullman, Estados Unidos) para confirmação e as medidas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagens de NaCl e KCl adicionadas em cada um dos tratamentos em um sistema modelo com 58,97% de umidade.

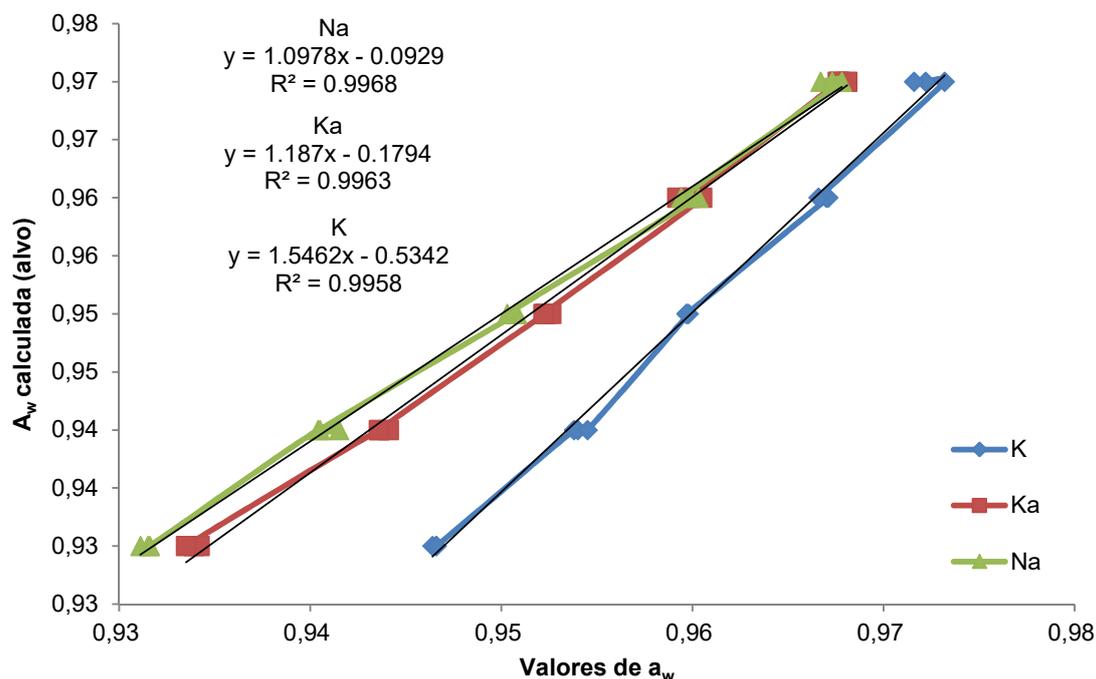
Atividade de água	Tratamentos		
	N - % NaCl	K % - % KCl	Ka - % KCl
0,93	6,21	6,21	7,34
0,94	5,23	5,23	6,26
0,95	4,28	4,28	5,19
0,96	3,36	3,36	4,11
0,97	2,47	2,47	3,05

N= ajuste de a_w com NaCl. K= substituição da porcentagem de NaCl por KCl. Ka = substituição na mesma molaridade de NaCl por KCl.

Ajuste de atividade de água em sistema modelo de emulsão cárnea

Nessa etapa avaliou-se o ajuste da a_w das emulsões cárneas, utilizando NaCl (tratamento N), KCl por simples substituição da porcentagem de NaCl (tratamento K) e KCl com ajuste de molaridade na substituição de NaCl (tratamento Ka). Este é o primeiro estudo que avaliou o ajuste de diferentes a_w com adição de NaCl e KCl na mesma molaridade em emulsões cárneas.

A substituição de NaCl pelo mesmo percentual de KCl resultou em emulsões com a_w diferentes. Quando a substituição foi feita baseando-se na molaridade e não na porcentagem foi verificada a_w similar entre os tratamentos N e K (Figura 1). O mesmo foi apresentado por Frølich et al. (2014), o qual demonstrou que uma solução com a mesma molaridade ajustadas com NaCl ou KCl apresentam atividades de água distintas, no qual a a_w das soluções com NaCl apresentam a_w maior que as soluções com KCl, sendo que quanto maior a molaridade, maior a diferença entre as a_w apresentadas.



N = ajuste de a_w com NaCl. K = substituição da porcentagem de NaCl por KCl. Ka = ajuste de a_w com KCl na mesma molaridade do tratamento N.

Figura 1. Valores de Atividade de água obtidos nos tratamentos N (NaCl), K (KCl) e Ka (mesma molaridade do tratamento N) em relação à a_w alvo.

2.2 Teste desafio com substituição de NaCl por KCl em mortadela armazenada sob temperatura de abuso

2.2.1 Preparo do inóculo e inoculação das amostras

A cepa *C. sporogenes* PA3679 (ATCC 7955) foi utilizada como *surrogate* de *C. botulinum* do Grupo I (Janganan et al., 2016), a mesma foi obtida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A manutenção da cultura foi realizada em *Cooked Meat Medium* (Acumedia, Neogen, Lansing, Estados Unidos) a 4°C.

A metodologia para preparo de solução de esporos foi realizada conforme Mah et al. (2008b). A solução de esporos de *C. sporogenes* foi preparada inoculando-se 1 μ L da cultura ativa em 10 mL de caldo TPGY (trypticase

peptone-glucose yeast extract broth) (50 g triptona (Acumedia), 20 g extrato de levedura (Difco, Sparks, Estados Unidos), 5 g peptona (Acumedia), 6 g dextrose ($C_6H_{12}O_6$, Êxodo, Brasil) e 1 g tioglicolato de sódio ($C_2H_3NaO_2S$, Vetec Química, Brasil), em 1 litro de água destilada). Em seguida, foi realizada incubação em anaerobiose a 32°C por 2 dias.

Após a incubação, foi transferida uma alíquota de 1 mL do cultivo para 100 mL de caldo TPGY, seguido de nova incubação. Então, uma alíquota de 10 mL deste cultivo foi transferida para 1 litro de caldo TPGY e esse foi incubado nas mesmas condições anteriores. Após esta última incubação, a cultura foi centrifugada a 14.000 rpm, a 4°C, por 10 min, seguida por três lavagens sucessivas em solução salina a 0,85%. O precipitado foi ressuspensão em 100 mL do meio para esporulação [60 g triptona (Acumedia), 1 g dextrose (Êxodo) e 1 g de tioglicolato de sódio (Vetec Química) suplementado com 5 g calcium carbonate (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) em 1 litro de água destilada, pH 5,0].

Em seguida, todo esse volume foi incorporado a 900 mL de meio de esporulação e incubado sob anaerobiose a 32°C por 10 dias. Então, foi realizada outra centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente e o precipitado obtido foi ressuspensão em 100 mL de solução tampão [5,675 g fosfato de sódio (Na_2HPO_4 , Êxodo) e 3,63 g fosfato de potássio (K_2HPO_4 , Êxodo) em 1L de água destilada, pH 7,0]. A contagem dos esporos presentes na suspensão do inóculo foi realizada conforme a metodologia descrita no item 2.2.3, a concentração final de esporos de *C. sporogenes* PA 3679 foi de aproximadamente 10^5 esporos/mL.

2.2.2 Processamento das amostras

Uma vez que o estudo objetivou avaliar o efeito do sal (NaCl e KCl) em diferentes atividades de água (0,95, 0,96 e 0,97), foram elaboradas amostras dos tratamentos a seguir:

N95: 0,95 de a_w ajustada com NaCl

N96: 0,96 de a_w ajustado com NaCl

N97: 0,97 de a_w ajustado com NaCl

K95: 0,95 de a_w ajustado com KCl na mesma molaridade do tratamento N95

K96: 0,96 de a_w ajustado com KCl na mesma molaridade do tratamento N96

K97: 0,97 de a_w ajustado com KCl na mesma molaridade do tratamento N97

Para obtenção da emulsão de mortadela foram empregados os procedimentos descritos a seguir. A carne congelada foi porcionada e triturada em discos de 12 mm (Hermann, 106, São Paulo, Brasil). A carne crua moída congelada foi colocada no cortador (Kramer & Grebe Karl Ernst Zippel, Biedenkopf-Wallau, Alemanha) e homogeneizada. Uma amostra foi retirada para análise de esporos de clostrídio sulfito redutor (Item 2.2.3) para garantir que na matéria prima não havia presença de esporos de *Clostridium* spp. Após isso, foi realizada a inoculação de 1 mL de inóculo de *C. sporogenes* PA3679 por quilo de emulsão e homogeneizado. Em seguida, foram adicionados os demais ingredientes que constam na Tabela 2. A emulsão foi homogeneizada no cortador até atingir 10-12°C.

Para determinação da umidade foi realizada a metodologia rápida por micro-ondas (Pettinati, 1975). As porcentagens dos sais (NaCl e KCl) necessárias para atingir as a_w alvo (0,95, 0,96 e 0,97) foram calculadas conforme descrito no item 2.1. Os sais foram adicionados às respectivas emulsões junto com o eritorbato a 0,04% (Tabela 2).

Após adição e homogeneização dos sais, 90 ± 5 g de cada emulsão, as mesmas foram colocadas em embalagens de filme polietileno (impermeável), que foram seladas a vácuo. O cozimento foi com vapor direto em estufa (HR 1, Schröter, Alemanha) até que o centro interno das amostras atingisse 74°C. Então, as amostras foram resfriadas em água corrente dentro da estufa até atingir 27°C no centro interno das amostras. A letalidade do processo térmico (P) foi de 70,5 min. As amostras foram mantidas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em câmara com temperatura controlada.

Tabela 2. Formulação da emulsão de mortadela antes e após a adição dos sais correspondentes a cada tratamento.

Ingredients	Emulsão	N95	N96	N97	K95	K96	K97
MSCM	60,00	57,25	57,83	58,40	56,54	56,68	57,98
Gel de pele de porco	12,00	11,45	11,57	11,68	11,04	11,34	11,60
Rim de porco	1,00	0,95	0,96	0,97	0,92	0,94	0,97
Fígado de porco	1,00	0,95	0,96	0,97	0,92	0,94	0,97
Carne de porco	16,38	15,63	15,79	15,94	15,08	15,47	15,83
Proteína texturizada de soja	3,50	3,34	3,37	3,41	3,22	3,31	3,38
Amido de mandioca	5,00	4,77	4,82	4,87	4,60	4,72	4,83
Açúcar refinado	0,60	0,57	0,58	0,58	0,55	0,57	0,58
Tripolifosfato de sódio	0,35	0,33	0,34	0,34	0,32	0,33	0,34
Pirofosfato ácido de sódio	0,15	0,14	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14
Nitrito	0,015	0,014	0,014	0,015	0,014	0,014	0,014
Eritorbato	0,00	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Cloreto de sódio	0,00	4,54	3,57	2,62	0,00	0,00	0,00
Cloreto de potássio	0,00	0,00	0,00	0,00	5,72	4,5	3,31

N95 = ajuste de 0,95 de a_w com NaCl; N96 = ajuste de 0,96 de a_w com NaCl; N97 = ajuste de 0,97 de a_w com NaCl; K95 = ajuste de 0,95 de a_w com KCl; K96 = ajuste de 0,96 de a_w com KCl; K97 = ajuste de 0,97 de a_w com KCl.

Nos dias 1, 15 e 30 foram realizadas as análises de pH, nitrito residual, contagem de esporos e células vegetativas de clostridio sulfito redutor, mesófilos aeróbios, enterobactérias e bactérias lácticas. Além disso, no primeiro dia após o processamento (Dia 1) também foram realizadas as análises de a_w , composição centesimal (umidade, proteína, cinzas, carboidratos e gordura) e caracterização microbiológica (*Salmonella* sp., *E. coli*, estafilococcus coagulase positivo e *Listeria monocytogenes*).

2.2.3 Análises microbiológicas

Foram analisadas três embalagens de cada tratamento, em cada um dos tempos, dentro de cada repetição de processamento (n=6).

A contagem de esporos e células vegetativas de *C. sporogenes* foi realizada na suspensão de esporos, na matéria prima cárnea e nas amostras inoculadas, conforme Labbe (2015). Amostras de 25 g foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada a 0,1% (Acumedia). Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas e plaqueamento em profundidade em SFP agar (Difco, EUA), com incubação em anaerobiose a 37°C por 48 h. Para contagem de esporos, as mesmas diluições foram submetidas a choque térmico a 80°C por 12 min em banho-maria, seguido por banho de gelo por 5 min. Após esse procedimento, foi feito plaqueamento e incubação, conforme descrito anteriormente. O resultado foi expresso em Unidades Formadoras de Colônias por mL (suspensão de esporos) ou g (matéria primas cárnea e amostras inoculadas da segunda etapa) mL.

As contagens de anaeróbio mesófilo foram realizadas de acordo com Ryser e Schuman (2015), bactérias lácticas segundo a ISO 15214 (1998b) e enterobactérias conforme Kornacki et al. (2015). Os resultados foram expressos em log UFC/g. Outras análises microbiológicas foram avaliadas na mortadela cozida (dia 1). *Escherichia coli* foi analisada de acordo com a ISO 7251 (2005), e os resultados foram expressos em Número Mais Provável (NMP/g); *Salmonella* sp. foi avaliada de acordo com a ISO 6579 (2007); estafilococcus coagulase-positivo segundo Bennett et al. (2015) e *Listeria monocytogenes* de acordo com a ISO 11290-2 (1998a).

2.2.3 Análises físico-químicas

As unidades experimentais do estudo foram amostras de 90 ± 5 g cada. Para as análises físico-químicas foram amostradas duas peças (duplicata de amostra) de cada tratamento por tempo em cada uma das duas repetições de processamento (n=4).

A composição centesimal (método 981.10 de proteína, método 985.14 de umidade, método 920.153 de cinzas and método 991.36 de lipídeos totais) foi realizada de acordo com AOAC (2005) e a análise de carboidratos foi realizada de acordo com Brasil (2018). A atividade de água foi determinada no produto final utilizando o analisador Aqualab 4TE (Decagon Devices, EUA) a $25,0 \pm 0,3$ °C.

O pH foi determinado utilizando pHmetro (Digimed modelo DM21, Brasil) com eletrodo de perfuração (Digimed, Brasil). O conteúdo de nitrito (mg/Kg) foi determinado como descrito em Brasil (2005), onde a absorbância de cada amostras foi medida em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de nitrito foi calculada baseada na curva analítica, usando solução padrão de nitrito de sódio.

2.2.4 Avaliação visual

O aspecto visual das amostras de mortadela foi documentado através de fotos ao longo do estudo.

2.2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparar os tratamentos ($p < 0,05$). O modelo estatístico incluiu os tratamentos e tempo de estocagem como efeitos fixos. Os dados foram avaliados usando o programa SAS (V.9.1 SAS Inst. Inc., Cary, NC).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste desafio em mortadela comercializada em temperatura ambiente com substituição equimolar de NaCl por KCl

As composições centesimais das matérias primas usadas para elaboração das mortadelas estão apresentadas na Tabela 3. A umidade variou de 61,5 a 63,4 g/100g, a proteína de 14,5 a 14,9 g/100g, carboidratos de 5,5 a 5,7 g/100g e gordura de 10,7 a 11,5 g/100g. O teor de cinzas aumentou de forma proporcional com a porcentagem de adição de sais (NaCl e KCl) de cada

tratamento (N95 = 5,6±0,2, N96 = 5,1±0,1, N97 = 4,1±0,0, K95 = 7,1±0,3, K96 = 6,0±0,0 e K97 = 4,7±0,1 g/100g). A a_w foi de 0,951±0,003 (N95), 0,958±0,001 (N96), 0,968±0,001 (N97), 0,952±0,002 (K95), 0,961±0,001 (K96) e 0,969±0,001 (K97).

Tabela 3. Composição centesimal das matérias primas.

Teor (g/100g)	Umidade	Proteína	Gordura	Cinzas
CMS	68,7±0,3	12,0±0,1	19,6±0,8	1,1±0,0
Carne de porco	71,6±0,0	19,4±0,0	7,7±0,1	1,1±0,0
Gel de pele de porco	64,2±1,3	13,8±0,2	21,6±1,7	0,2±0,0
Rim de porco	75,1±0,6	17,7±0,2	6,0±0,6	1,2±0,0
Fígado de porco	71,9±0,1	6,0±0,1	6,0±0,1	1,4±0,0

Valores correspondem a média ± desvio-padrão, n=2.

Com relação as amostras de mortadela, apenas os tratamentos com a_w de 0,95 foram analisados até os 30 dias de estocagem a 35°C, uma vez que os tratamentos com a_w 0,96 e 0,97 apresentaram germinação significativa dos esporos de *C. sporogenes* a partir de 15 dias. Ao longo do período de estocagem foi observada redução significativa nos valores de pH para a maioria dos tratamentos ($p < 0,05$). Todavia, nenhuma amostra atingiu valores abaixo do limite mínimo de crescimento do grupo de *C. botulinum* proteolítico, ou seja, 4,6 (ICMSF, 1996).

Não foi observada diferente estatística ($p > 0,05$) entre os teores de nitrito residual dos diferentes tratamentos. As concentrações variaram de 110,42 a 115,41 ppm e de 2,20 a 2,68 ppm, após 1 e 15 dias de estocagem, respectivamente. Geralmente, a concentração máxima de nitrito de sódio (NaNO_2) em produtos cárneos é de 150 ppm (Austin, 2014). Devido aos baixos teores observados nas amostras coletas após 15 dias, optou-se por não realizar a análise aos 30 dias de estocagem. O nitrito pode reagir ou se ligar a diversos constituintes da matriz cárnea, uma vez que é um composto extremamente reativo, diminuindo rapidamente a quantidade detectável durante a estocagem (Alahakoon et al., 2015).

Tabela 4. Valores de pH das mortadelas armazenadas a 35°C.

Tratamento	Dia 1	Dia 15	Dia 30
N95	6,15 ± 0,04 Ad	5,74 ± 0,07 Bcd	5,30 ± 0,10 Cb
N96	6,15 ± 0,03 Ad	5,65 ± 0,15 Bd	-
N97	6,22 ± 0,02 Ac	6,28 ± 0,16 Ab	-
K95	6,25 ± 0,03 Abc	5,76 ± 0,03 Bd	5,46 ± 0,06 Ca
K96	6,27 ± 0,03 Aab	5,98 ± 0,19 Bc	-
K97	6,30 ± 0,02 Aa	6,68 ± 0,17 Ba	-

Valores correspondem a média ± desvio-padrão de duplicatas do processo. Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

N95 = ajuste de 0,95 de a_w com NaCl; N96 = ajuste de 0,96 de a_w com NaCl; N97 = ajuste de 0,97 de a_w com NaCl; K95 = ajuste de 0,95 de a_w com KCl; K96 = ajuste de 0,96 de a_w com KCl; K97 = ajuste de 0,97 de a_w com KCl.

As embalagens do presente estudo foram seladas à vácuo para simular a forma de comercialização das mortadelas comercializadas em temperatura ambiente. Todavia, sabe-se que *C. sporogenes*, assim como *C. botulinum* são bactérias anaeróbicas, ou seja, crescem na ausência de oxigênio (WHO, 2018). As Figuras 2a e 2b apresentam o aspecto visual das amostras de mortadela, após 15 e 30 dias de armazenamento a 35°C. No Dia 1, todas as embalagens apresentavam vácuo e amostras com coloração característica de mortadela (dados não mostrados). Após 15 dias (Figura 2a), as amostras dos tratamentos N97, K96 e K97 apresentaram formação de gás. Além disso, foi verificada presença de manchas negras nas amostras do tratamento K97. Todavia, as embalagens das amostras dos tratamentos N95 e K95 (Figura 2b) apresentaram vácuo ao longo de todo o período de estocagem.

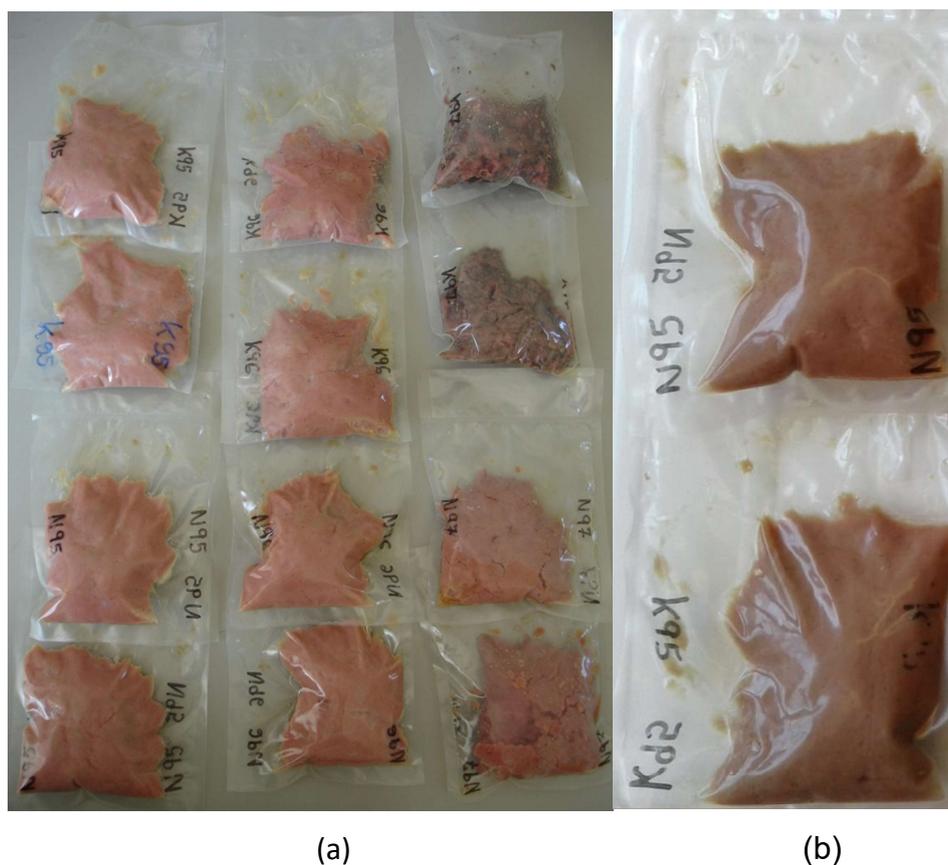


Figura 2. Aspecto visual das amostras de mortadela após 15 (a) e 30 dias (b) de estocagem a 35°C.

Em relação às análises microbiológicas, não foi detectada a presença de esporos de clostrídio sulfito redutor na matéria prima utilizada no estudo (<1,0 log UFC/g). Os resultados microbiológicos apresentaram-se dentro dos padrões da RDC nº12 da ANVISA (Brasil, 2001), ou seja, contagem de *E. coli* <3,0 NMP/g, estafilococcus coagulase positiva <1,0 log UFC/g, *Salmonella* sp. ausente em 25 g e clostridio sulfito redutor a 46°C <1,0 log UFC/g. A contagem total de mesófilos aeróbios variou de 1,2 a 2,5 UFC/g no dia 1 e de 5,6 a 6,6 UFC/g após 15 dias. Além disso, após 30 dias a contagem foi de 6,2 UFC/g no tratamento N95 e de 6,3 UFC/g no tratamento K95.

Os valores destacados (negrito) na Tabela 5 diferem significativamente ($p < 0,05$) das contagens do primeiro dia de estocagem (Dia 1).

Tabela 5. Contagem de *C. sporogenes* (log UFC/g) em mortadela inoculadas e armazenadas a 35°C.

Tratamento	Contagem de <i>C. sporogenes</i> (log UFC/g)					
	Dia 1		Dia 15		Dia 30	
	Esporos	Esporos e cls. Vegetativas	Esporos	Esporos e cls. Vegetativas	Esporos	Esporos e cls. vegetativas
N95	2,0 ± 0,1 h	2,1 ± 0,1 gh	2,6 ± 0,2 fgh	2,5 ± 0,5 fgh	2,7 ± 0,2 fgh	2,4 ± 0,2 fgh
N96	2,0 ± 0,1 h	2,0 ± 0,1 h	2,7 ± 0,2 fgh	5,1 ± 0,3 d	NR	NR
N97	2,0 ± 0,1 h	2,2 ± 0,2 gh	7,5 ± 0,5 ab	8,2 ± 0,2 a	NR	NR
K95	2,1 ± 0,4 gh	2,2 ± 0,3 gh	2,9 ± 0,5 fg	4,1 ± 1,5 e	3,2 ± 0,4 ef	6,0 ± 0,9 c
K96	2,0 ± 0,1 h	2,2 ± 0,3 gh	6,1 ± 0,3 c	7,1 ± 0,2 b	NR	NR
K97	1,9 ± 0,1 h	2,2 ± 0,2 gh	7,5 ± 0,2 ab	8,3 ± 0,4 a	NR	NR

N95 = ajuste de 0,95 de a_w com NaCl; N96 = ajuste de 0,96 de a_w com NaCl; N97 = ajuste de 0,97 de a_w com NaCl

K95 = ajuste de 0,95 de a_w com KCl; K96 = ajuste de 0,96 de a_w com KCl; K97 = ajuste de 0,97 de a_w com KCl

Valores representam média ± desvio-padrão, n=6

Letra maiúsculas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

NR = não realizado

A avaliação do efeito dos tratamentos sobre o *C. sporogenes* foi realizado com a contagem de esporos e esporos mais células vegetativas. O crescimento do microrganismo é observado quando há diferença de contagem entre os intervalos de tempo de análise ou, quando na mesma amostra a contagem de esporos e células vegetativas é maior que a contagem de esporos. Após 15 dias de estocagem os tratamentos com a_w 0,97 (N97 e K97) apresentaram as maiores contagens de esporos e células vegetativas ($p < 0,05$), ademais o tratamento com KCl e a_w 0,96 também apresentou germinação dos esporos. Evidenciando que a a_w apresenta efeito inibitório na germinação de esporos de *C. sporogenes* e que o tipo de sal também apresenta efeito, sendo que o NaCl foi mais eficiente que o KCl, quando se observa a a_w 0,96.

Para a_w de 0,96, o tratamento com KCl (K96) apresentou contagem significativamente maior ($p < 0,05$) que o elaborado com NaCl (N96), tanto para esporos quanto para células vegetativas mais esporos. Isso demonstra que o sal utilizado para o ajuste da a_w também apresenta efeito sobre a germinação dos esporos de *C. sporogenes*. Após 30 dias de estocagem, apenas o tratamento com ajuste de a_w 0,95 elaborado com NaCl não apresentou diferença significativa das contagens obtidas no início do estudo (dia 1). Os resultados apresentados condizem com a avaliação visual apresentada.

Embora seja geralmente aceito que condições que suportam a germinação de esporos e o crescimento das células vegetativas também permitirão a produção de toxinas, não há consenso sobre as populações mínimas de *C. botulinum* ou o aumento logarítmico que se correlaciona com a produção detectável de toxinas (Glass & Marshall, 2013). Vários estudos correlacionaram a produção de toxinas detectáveis com contagem de célula vegetativa de 4 a 5 log UFC / g (Carlin & Peck, 1996; Ikawa, 1991). Entretanto, outros estudos demonstraram que a produção de neurotoxina botulínica pode ser detectada quando as populações aumentam não mais que 1 ciclo logaritmo ou antes de qualquer aumento na contagem de placas (Austin, 1998; Larson, 2002).

Portanto, os tratamentos que apresentaram germinação dos esporos de *C. sporogenes* não seriam seguros frente ao microrganismo, visto que após uma eventual germinação de esporos de *C. botulinum* pode ocorrer produção de

neurotoxina. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2018), o crescimento de células vegetativas de *C. botulinum* e a formação de toxina ocorrem em produtos com baixo teor de oxigênio e combinações de temperatura de armazenamento e parâmetros de conservação.

No presente estudo, apenas o tratamento com NaCl a 0,95 de a_w apresentou uma combinação que impediu a germinação de esporos de *C. sporogenes* em mortadela armazenadas por 30 dias a 35°C. Vale ressaltar que as amostras tinham a característica de serem conservadas a temperatura ambiente, o que inviabiliza comparar estes resultados com artigos que trabalharam com produtos armazenados sob refrigeração. Isto porque a temperatura de refrigeração inibe *C. botulinum*, particularmente os tipos proteolíticos, assim como seu surrogate *C. sporogenes*. A escolha pela temperatura de abuso de 35°C fez-se com o objetivo de avaliar a robustez das formulações em países ou regiões de clima tropical.

O sal é um ingrediente comum em produtos cárneos, apresentando três principais funções: preservação, extração de proteínas miofibrilares e sabor. A solubilização de proteínas do músculo pelo sal (NaCl) pode ser alcançada com substitutos do sal como o KCl, $MgCl_2$ e $CaCl_2$. Dentre estes, o KCl apresenta a maior eficiência na solubilização de proteínas (Puolanne & Halonen, 2010), sendo o mais usado.

Um estudo avaliou bactérias patogênicas (*Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter sakazakii*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* e 3 cepas de *Staphylococcus aureus*) e mostrou que o cloreto de potássio tem um efeito antimicrobiano equivalente sobre os microrganismos avaliados quando se calcula o KCl na mesma base molar do NaCl em caldo (Bidlas e Lambert, 2008). Em outro estudo, concentrações equimolares de NaCl e KCl em caldo exerceram um efeito inibitório similar contra *Listeria monocytogenes* em termos de duração de fase lag, taxa de crescimento e morte (Bozaris et al., 2007).

Barbut et al (1986) avaliaram o efeito de diferentes sais (NaCl, KCl e $MgCl_2$) sobre a produção de toxina botulínica em salsicha de peru armazenada a 27°C. Tal estudo teve como alvo as porcentagens de NaCl e suas respectivas forças iônicas para os demais sais. Os autores observaram que um aumento de força iônica de 0,42 para 0,68 retardava a produção de toxina de 4 para 40 dias

(Barbut et al., 1986). No presente estudo também foi observado que o aumento da força iônica retarda a germinação dos esporos e o crescimento de *C. sporogenes*.

No estudo de Barbut et al (1986), o KCl apresentou o mesmo efeito a uma força iônica de 0,42, contudo com força iônica maior, seu efeito foi menor que o observado para NaCl. Estas observações corroboram com os resultados do presente estudo, no qual os tratamentos com NaCl e KCl apresentaram o mesmo comportamento em relação à germinação de esporos e crescimento de *C. sporogenes* em a_w 0,97. Porém, os tratamentos com KCl apresentaram menor efeito antimicrobiano frente aos tratamentos com NaCl nas a_w 0,95 e 0,96 (maior força iônica). Neste sentido, um estudo sobre a sobrevivência de bactérias em meio de tioglicolato também concluiu que as respostas bacterianas podem ser dependentes do soluto (Strong et al., 1970). Em tal estudo, os ajustes para garantir os níveis desejados de a_w foram feitos com NaCl, KCl ou glicose, sendo que o soluto influenciou no crescimento de *C. perfringens* em uma mesma a_w (Strong et al. 1970).

Além do efeito direto da toxicidade do íon Cl^- , causado pela remoção de oxigênio do meio, o NaCl aumenta a sensibilidade das bactérias em relação ao CO_2 , assim como o efeito sobre as proteínas bacterianas incluindo enzimas (Rockwell & Ebertz 1924), mas o mecanismo exato da toxicidade do íon Cl^- para bactérias não está completamente elucidado (Taormina 2010). Por exemplo, um estudo demonstrou que não houve diferença significativa entre a taxa de esporulação de *C. sporogenes* exposto a um meio contendo CaCO_3 e pH 5,0 ou CaCl_2 (Mah et al., 2008a). Porém, no estudo de Juneja et al. (2003), o aumento de níveis de NaCl e pirofosfato de sódio aumentaram de forma significativa a resistência térmica de sorotipos de *Salmonella* em carne moída, indicando que o íon Na^+ seria um componente ativo do NaCl.

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que a substituição de NaCl por KCl na mesma base molar não manteve o mesmo efeito sobre a germinação de esporos de *C. sporogenes*. Apesar da substituição total do NaCl por KCl não ser praticada pela indústria em função do impacto sensorial negativo, gosto metálico do KCl (Morris et al., 2010), este estudo ressalta a importância de investigação do efeito de substitutos do NaCl sobre diferentes

microrganismos patogênicos, com destaque para os esporulados, nos quais a atividade de água é uma importante barreira.

4. CONCLUSÕES

A atividade de água em produtos cárneos é uma barreira importante na germinação de esporos de *C. sporogenes*, porém, observou-se no presente estudo que o sal utilizado para o ajuste da a_w também apresenta efeito sobre o microrganismo alvo. Ainda que a substituição total do NaCl pelo KCl não seja praticada pela indústria em função dos impactos negativos no sabor foi evidenciado que essa substituição afeta a segurança microbiológica do produto. Desta forma, é necessário que seja conduzido teste de desafio em produtos cárneos formulados com substituições parciais do NaCl, em que a atividade de água seja um parâmetro determinante da segurança microbiológica.

5. REFERÊNCIAS

- Alahakoon, A. U., Jayasena, D. D., Ramachandra, S., & Jo, C. (2015). Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 37-49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.05.008>.
- Adhikari, A., Yemmireddy, V. K., Costello, M. J., Gray, P. M., Salvadalena, R., Rasco, B., & Killinger, K. (2018). Effect of storage time and temperature on the viability of *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp., *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium sporogenes* vegetative cells and spores in vacuum-packed canned pasteurized milk cheese. *International journal of food microbiology*, 286, 148-154.
- Austin, J. W. (2014). Microbiological safety of meat - *Clostridium botulinum* and Botulism. In Dikeman, M., Devine, C. (Eds.), *Encyclopedia of Meat Sciences* (pp.330-334) (2th ed.).
- AOAC. (2005). *Official methods of analysis*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Austin JW, Dodds KL, Blanchfield B, Farber JM. (1998). Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* on inoculated fresh-cut packaged vegetables. *J Food Prot.* 61:324–8.

- Barbut, S., Tanaka, N., & Maurer, A. J. (1986). Effects of varying levels of chloride salts on *Clostridium botulinum* toxin production in turkey frankfurters. *Journal of Food Science*, 51(5), 1129-1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1986.tb13064.x>.
- Bennett, R. W., Hait, J. M., & Tallent, S. M. (2015). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 509-526). American Public Health Association, Washington.
- Bhattacharjee, D., McAllister, K. N., & Sorg, J. A. (2016). Germinants and their receptors in Clostridia. *Journal of bacteriology*, 198(20), 2767-2775. <https://doi.org/10.1128/JB.00405-16>.
- Bidlas, E., & Lambert, R. J. (2008). Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 98-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.031>.
- Bozariis, I. S., Skandamis, P. N., Anastasiadi, M., & Nychas, G. J. (2007). Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology*, 102(3), 796-805. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03117.x>.
- BRASIL. (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 10 jan. 2001, seção 1.
- BRASIL. (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa número 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal, indexado ao International Standard Book Number (ISBN). *Diário Oficial da União*, Brasília, 13 de julho de 2018, seção 1, nº 134, p. 09.
- BRASIL. (2005). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Adolfo Lutz.
- BRASIL. (1981). Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos analíticos

oficias para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II Métodos físicos e químicos. Brasília, 1981. Cap.2,p.14-15:Salsicharia. Método 8. BRASIL. (2014). Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica do Botulismo – Brasil, 2014. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/30/Gr--ficos--Botulismo---2.pdf>. Accessed 17 October 2016.

Carlin, F. & Peck M. W. Growth of and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in cooked pureed vegetables at refrigeration temperatures. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:3069–72.

EC. European Commission. 2008. Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. *Official Journal of the European Communities*, 50, 18. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:en:PDF>. Accessed in: 29 April 2020.

El Jaam, O., Fliss, I., & Aïder, M. (2017). Effect of electro-activated aqueous solutions, nisin and moderate heat treatment on the inactivation of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores in green beans puree and whole green beans. *Anaerobe*, 47, 173-182.

Frølich, W., Andreassen, Å. K., Arukwe, A., Bernhoft, A., Dahl, K. H., Eckner, K. F., ... & Källqvist, T. (2014). Benefit and risk assessment of increasing potassium by replacement of sodium chloride with potassium chloride in industrial food Production. Opinion of the Scientific Steering Committee. VKM Report.

Glass, K., & Marshall, K. (2013). *Clostridium botulinum*. In *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 371-387). Academic Press.

Golden, M. C., Wanless, B. J., David, J. R., Lineback, D. S., Talley, R. J., Kottapalli, B., & Glass, K. A. (2017). 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*, 80(8), 1252-1258.

Hong, Y. K., Huang, L., & Yoon, W. B. (2016). Mathematical modeling and growth kinetics of *Clostridium sporogenes* in cooked beef. *Food Control*, 60, 471-477. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.035>.

ICMSF. (1996). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods 5: Characteristics of microbial pathogens (Vol. 5). Springer Science & Business Media.

Ikawa JY. (1991). *Clostridium botulinum* growth and toxigenesis in shelf-stable noodles. *J Food Sci.* 56:264–5.

ISO (2007). ISO 6579:2002/Amd 1:2007. Detection of *Salmonella* spp. in animal feces and in environmental samples from the primary production stage, amendment 1, annex D. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp, Geneva, Switzerland.

ISO (2005). International Organization for Standardization. ISO 7251:2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection and enumeration of presumptive *Escherichia coli* – most probable number technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (1998a). International Organization for Standardization. ISO 11290-2: 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* Part 2: Enumeration method, Geneva, Switzerland.

ISO (1998b). International Organization for Standardization. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic bacteria, Geneva, Switzerland.

Janganan, T.K; Mullin N.; Tzokov S.B., et al. (2016). Characterization of the spore surface and exosporium proteins of *Clostridium sporogenes*; implications for *Clostridium botulinum* group I strains. *Food Microbiology.* 59:205-212. doi:10.1016/j.fm.2016.06.003.

Juneja, V. K., Marks, H. M., & Mohr, T. (2003). Predictive thermal inactivation model for effects of temperature, sodium lactate, NaCl, and sodium pyrophosphate on *Salmonella* serotypes in ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(9), 5138-5156.

Kornacki, J.L, Gurtler, J.B., & Stawick, B.A. (2015). Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. (Eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, 995p.

- Krispien, K.; Rödel, W.; Leistner, L. (1979). 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.
- Labbe, R. G. (2015). *Clostridium perfringens*. Chapter 33, p. 403-410. In Salfinger, Y., & Tortorello, M. L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 995). American Public Health Association, Washington.
- Larson AE. (2002). Comparison of methods to evaluate the botulinal safety of foods. University of Wisconsin-Madison. Unpublished master's thesis.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International journal of food microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Mah, J. H., Kang, D. H., & Tang, J. (2008a). Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. *International journal of food microbiology*, 128(2), 385-389.
- Mah, J. H., Kang, D. H., & Tang, J. (2008b). Morphological study of heat-sensitive and heat-resistant spores of *Clostridium sporogenes*, using transmission electron microscopy. *Journal of food protection*, 71(5), 953-958. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.5.953>.
- Molins, R. A., Kraft, A. A., Walker, H. W., & Olson, D. G. (1985). Effect of poly- and pyrophosphates on the natural bacterial flora and inoculated *Clostridium sporogenes* PA 3679 in cooked vacuum packaged bratwurst. *Journal of Food Science*, 50(4), 876-880.
- Morris, C., Labarre, C., Koliandris, A. L., Hewson, L., Wolf, B., Taylor, A. J., & Hort, J. (2010). Effect of pulsed delivery and bouillon base on saltiness and bitterness perceptions of salt delivery profiles partially substituted with KCl. *Food Quality and Preference*, 21(5), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.01.002>.
- Nakamura, S., I. Okado, S. Nakashio, & S. Nishida. (1977). *Clostridium sporogenes* isolates and their relationship to *C. botulinum* based on deoxyribonucleic acid reassociation. *J. Gen. Microbiol.* 100:395–401.
- OUAGARI, Z. et al. (2002). Le botulisme à Casablanca. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, Paris, 95 (4), 272- 275.

- Pettinati, J. D. (1975). Microwave oven method for rapid determination of moisture in meat. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 58(6), 1188-1193. <https://doi.org/10.1093/jaoac/58.6.1188>.
- Puolanne, E., & Halonen, M. (2010). Theoretical aspects of water-holding in meat. *Meat Science*, 86(1), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.038>.
- Rockwell, G. E., & Ebertz, E. G. (1924). How salt preserves. *The Journal of Infectious Diseases*, 573-575.
- Ryser, E., Schuman, J.D. (2015). Mesophilic aerobic plate count. In Salfinger, Y., Tortorello, M. L. (Eds.) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (pp. 995). American Public Health Association, Washington.
- Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat science*, 70(3), 531-541. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.016>.
- Savani, J., Harris, N. D., & Gould, W. A. (1978). SURVIVAL OF *CLOSTRIDIUM SPOROGENES* PA 3679 IN HOME-CANNED TOMATOES. *Journal of Food Science*, 43(1), 222-224.
- Scalfaro, C., Auricchio, B., De Medici, D., & Anniballi, F. (2019). Foodborne botulism: an evolving public health challenge. *Infectious Diseases*, 51(2), 97-101. <https://doi.org/10.1080/23744235.2018.1524584>.
- Schocken-Iturrino, R. P., Carneiro, M. C., Kato, E., Sorbara, J. O., Rossi, O. D., & Gerbasi, L. E. (1999). Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brasil. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 24(3), 379-382. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01309.x>.
- Sebahia, M., Peck, M. W., Minton, N. P., Thomson, N. R., Holden, M. T., Mitchell, W. J., ... & Paul, C. J. (2007). Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome research*, 17(7), 1082-1092.
- Strong, D. H., Foster, E. F., & Duncan, C. L. (1970). Influence of water activity on the growth of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 19(6), 980-987.
- Taormina, P. J. (2010). Implications of salt and sodium reduction on microbial food safety. *Critical reviews in food science and nutrition*, 50(3), 209-227.

USDA. (2015). Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2015–2020 Dietary guidelines for Americans, 8th ed. <https://health.gov/our-work/food-nutrition/2015-2020-dietary-guidelines>.

Accessed 25 March 2020.

WHO. World Health Organization. 2012. Guideline: Sodium intake for adults and children.

http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sodium_intake_printversion.pdf. Accessed in: 29 April 2020.

WHO. World Health Organization. 2018. Botulism Fact Sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/botulism>. Accessed in: 30 March 2020.

Wu, J. I. J., H. Rieman, and W. H. Lee. 1972. Thermal stability of the deoxyribonucleic acid hybrids between the proteolytic strains of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. *Can. J. Microbiol.* 18:97–99.

Zhu, S., Naim, F., Marcotte, M., Ramaswamy, H., & Shao, Y. (2008). High-pressure destruction kinetics of *Clostridium sporogenes* spores in ground beef at elevated temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 86-92.

DISCUSSÃO GERAL

A mortadela de baixo custo, elaborada com até 60% de carne mecanicamente separada, além de miúdos e pele, submetida a cozimento em envoltório impermeável é um produto que requer rigoroso conhecimento dos fatores que assegurem sua segurança, especialmente em países de clima tropical com dimensões continentais como o Brasil e deficiências na sua cadeia de frio. Esta mortadela, assim como outros produtos pasteurizados brasileiros, apresenta características muito distintas das observadas em produtos similares elaborados em outros países, portanto a avaliação da segurança microbiológica desses produtos deve ser priorizada.

O *Clostridium botulinum* é o microrganismo que representa o maior perigo microbiológico nesta categoria de produto cárneo comercializado em temperatura ambiente e o uso de um microrganismo similar se mostra uma alternativa para a avaliação da segurança microbiológica.

Muitos estudos já foram realizados com *C. botulinum* para validação de processos térmicos em alimentos de baixa acidez e comercializados em temperatura ambiente (Brown et al., 2012). Porém, devido ao alto risco de segurança microbiológica, atualmente não se recomenda mais este tipo de estudo (Brown et al., 2012). Deste modo, a cepa de *C. sporogenes* PA 3679 tem sido largamente utilizada como um modelo de organismo não toxigênico para o *C. botulinum* proteolítico do Grupo I, com a finalidade de validar processos térmicos para alimentos enlatados de baixa acidez (Jaam et al., 2016). Além disso, o *C. sporogenes* PA 3679 tem sido utilizado também como substituto do *C. botulinum* proteolítico em estudos para avaliar a segurança microbiológica em relação à germinação de esporos e crescimento de células vegetativas [Diao et al. (2014), Brown et al. (2012), Bradbury et al. (2012), Khanipour et al. (2016), Taylor et al. (2013)].

No estudo que avaliou o efeito do nitrito residual e do eritorbato sobre o *C. sporogenes* em mortadela comercializada em temperatura ambiente, os tratamentos avaliados foram: sem nitrito, sem eritorbato e a_w 0,95 (SNSE); sem nitrito, com eritorbato e a_w 0,95 (SNCE); com nitrito, sem eritorbato e a_w 0,95

(CNSE); com nitrito, com eritorbato e a_w 0,95 (CNCE); e com nitrito, com eritorbato e a_w 0,97 (controle). Os resultados microbiológicos demonstraram que nos tratamentos com a_w 0,95 (SNSE, SNCE, CNSE e CNCE) tanto a contagem de esporos quanto a contagem de esporos mais células vegetativas de *C. sporogenes* permaneceram próximos a 3,0 log UFC/g ao longo de 90 dias. O controle (a_w 0,97) apresentou contagens de 5,6 a 6,5 log UFC/g de células vegetativas e esporos de *C. sporogenes* após 60 e 90 dias, respectivamente, significativamente maiores ($p < 0,05$) que os demais tratamentos. Estes dados indicam que houve germinação dos esporos apenas no tratamento controle, o qual apresentava maior a_w (0,97) em comparação aos outros tratamentos (0,95), demonstrando o efeito dominante da a_w na inibição da germinação e do crescimento de *C. sporogenes*. Deste modo, pode-se inferir que ainda que o produto contenha nitrito e seja adicionado de acelerador de cura, que sabidamente exerce influência nas reações que o nitrito sofre durante a cura, as quais impactam em especial a segurança microbiológica, observou-se neste estudo que, quando a atividade de água é 0,95, o produto não propicia a germinação dos esporos de *Clostridium sporogenes* PA3679, mesmo na ausência de nitrito, confirmando o alto impacto desta barreira na segurança do produto. Segundo a International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2011), a segurança e a estabilidade de produtos cárneos curados comercializados em temperatura ambiente dependem do efeito combinado da destruição térmica ou injúria de um pequeno número de esporos e a inibição dos esporos sobreviventes pela adição de quantidade adequada de sal e nitrito de sódio. Todavia, mudanças recentes na preferência dos consumidores pelos alimentos minimamente processados com características de natural, como produtos com baixo teor de sal, sem aditivos, minimamente tratados termicamente e embalados a vácuo; junto com a globalização da indústria de alimentos, aumentaram o risco de botulismo de origem alimentar. Ressalta-se que a adição de sal está diretamente relacionada à redução de atividade de água, a qual no presente estudo apresentou-se como importante fator de inibição do crescimento e da germinação de esporos de *C. sporogenes* PA 3679.

Porém, para que a atividade de água de 0,95 possa ser atingida, a concentração salina deve ser elevada, o que contraria as recomendações de saúde, que são de redução da ingestão de sódio, assim sendo, duas foram as estratégias para se avaliar a possibilidade de redução de sódio, quais sejam, adição de sorbato de potássio e a substituição do cloreto de sódio por cloreto de potássio.

No estudo do efeito da adição de sorbato de potássio e da a_w sobre *C. sporogenes* PA3679 em mortadela comercializada em temperatura ambiente, os tratamentos avaliados foram: sem sorbato e a_w 0,960 (SS960), com sorbato e a_w 0,960 (CS960), sem sorbato e a_w 0,965 (SS965) e com sorbato e a_w 0,965 (CS965). Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa ($p>0,05$) na contagem de esporos ao longo do período de estocagem. Nenhum dos tratamentos apresentou crescimento de células vegetativas até 30 dias de armazenamento ($p>0,05$). Os tratamentos com a_w menor (CS960 e SS960) não apresentaram aumento de contagem de células vegetativas de *C. sporogenes* ao longo dos 90 dias ($p>0,05$). Por outro lado, o tratamento menos desafiador ao crescimento de microrganismos, ou seja, com maior a_w (0,965) e sem sorbato, S965, apresentou crescimento significativo ($p<0,05$) de células vegetativas a partir de 60 dias de estocagem, com contagem de 6,8 log UFC/g após 90 dias. O efeito do sorbato foi evidenciado quando comparados os tratamentos CS965 e SS965, a diferença na contagem de células vegetativas de *C. sporogenes* foi de 2,5 e 2,7 log UFC/g após 60 e 90 dias, respectivamente.

Embora seja geralmente aceito que condições que suportam a germinação de esporos e o crescimento das células vegetativas também propiciam a produção de toxinas, não há consenso sobre as populações mínimas de *C. botulinum* necessárias para a produção de neurotoxinas (Glass & Marshall, 2013). Deste modo, o estudo evidenciou que o sorbato pode impactar a segurança da mortadela possibilitando o aumento da atividade de água sem comprometimento da segurança microbiológica em relação à germinação de esporos de *Clostridium sporogenes* PA3679, pois não foi evidenciada a germinação até 30 dias de armazenamento da mortadela com atividade de água de 0,96. Por outro lado, há estudos que evidenciaram sua ação carcinogênica

quando usado em conjunto com nitrito de sódio, além do período de 30 dias ser incompatível com a vida útil necessária para a comercialização dessa mortadela que é distribuída em todo território brasileiro.

Na avaliação do impacto da substituição de NaCl por KCl sobre *C. sporogenes* PA3679 em mortadela comercializada em temperatura ambiente, as a_w alvos dos produtos foram 0,95, 0,96 e 0,97, tanto para formulação com NaCl quanto para KCl. Apenas os tratamentos com a_w de 0,95 foram analisados até os 30 dias de estocagem a 35°C, uma vez que os tratamentos com a_w 0,96 e 0,97 apresentaram germinação significativa dos esporos de *C. sporogenes* a partir de 15 dias. As embalagens do presente estudo foram seladas a vácuo para simular a forma de comercialização das mortadelas em temperatura ambiente. No aspecto visual das amostras de mortadela, no Dia 1, todas as embalagens apresentavam vácuo e amostras com coloração característica de mortadela. Após 15 dias, as amostras dos tratamentos N97 (NaCl; a_w 0,97), K96 (KCl; a_w 0,96) e K97 (KCl; a_w 0,97) apresentaram formação de gás. Além disso, foi verificada a presença de manchas negras nas amostras do tratamento K97. Todavia, as embalagens das amostras dos tratamentos N95 (NaCl; a_w 0,95) e K95 (KCl; a_w 0,95) apresentaram vácuo ao longo de todo o período de estocagem. Em relação à avaliação do efeito dos tratamentos sobre o *C. sporogenes*, após 15 dias de estocagem os tratamentos com a_w 0,97 (N97 e K97) apresentaram as maiores contagens de esporos e células vegetativas ($p < 0,05$), $\geq 7,5 \log$ UFC/g. Para a_w de 0,96, o tratamento com KCl (K96) apresentou contagem significativamente maior ($p < 0,05$) que o elaborado com NaCl (N96), tanto para esporos quanto para células vegetativas mais esporos. Isso demonstra que o sal utilizado para o ajuste da a_w também apresenta efeito sobre a germinação dos esporos de *C. sporogenes*. Após 30 dias de estocagem, apenas o tratamento com ajuste de a_w 0,95 elaborado com NaCl não apresentou diferença significativa das contagens obtidas no início do estudo (dia 1). Uma vez que, não há consenso sobre as populações mínimas de *C. botulinum* ou o aumento logarítmico que se correlaciona com a produção detectável de toxinas (Glass & Marshall, 2013), os tratamentos que apresentaram germinação dos esporos de *C. sporogenes* não seriam seguros frente ao microrganismo. Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que a substituição

de NaCl por KCl na mesma base molar não manteve o mesmo efeito sobre a germinação de esporos de *C. sporogenes*. Apesar da substituição total do NaCl por KCl não ser praticada pela indústria em função do impacto sensorial negativo, devido ao gosto metálico do KCl (Morris et al., 2010), este estudo ressalta a importância de investigação do efeito de substitutos do NaCl sobre diferentes microrganismos patogênicos, com destaque para os esporulados, nos quais a atividade de água é uma importante barreira.

Assim, a redução do teor de sódio da mortadela de baixo custo, foi avaliada em relação à segurança do produto quando se substituiu o cloreto de sódio pelo cloreto de potássio e observou-se a germinação dos esporos, mesmo na atividade de água de 0,95. Estes resultados de maior importância ratificam a necessidade de se conduzir teste de desafio, caso esta alternativa seja proposta para a redução de sódio, mesmo que a substituição seja parcial, especialmente em produtos altamente dependentes da atividade de água para sua segurança, como é o caso da mortadela.

CONCLUSÃO GERAL

A mortadela de baixo custo, elaborada com até 60% de carne mecanicamente separada, além de miúdos e pele, submetida a cozimento em envoltório impermeável é um produto que requer rigoroso conhecimento dos fatores que assegurem sua segurança, especialmente em países de clima tropical com dimensões continentais como o Brasil e deficiências na sua cadeia de frio. Esta mortadela, assim como outros produtos pasteurizado brasileiros, apresenta características muito distintas das observadas em produtos similares elaborados em outros países, portanto a avaliação da segurança microbiológica desses produtos deve ser priorizada.

O *Clostridium botulinum* é o microrganismo que representa o maior perigo microbiológico nesta categoria de produto cárneo comercializada em temperatura ambiente e o uso de um microrganismo similar se mostra uma alternativa para a avaliação da segurança microbiológica.

Ainda que o produto contenha nitrito e seja adicionado de acelerador de cura, que sabidamente exerce influência nas reações que o nitrito sofre durante a cura, as quais impactam em especial a segurança microbiológica, observou-se neste estudo que, quando a atividade de água é 0,95, o produto não propicia a germinação dos esporos de *Clostridium sporogenes* PA3679, mesmo na ausência de nitrito, confirmando o alto impacto desta barreira na segurança do produto.

Para que a atividade de água de 0,95 possa ser atingida, a concentração salina deve ser elevada, o que contraria as recomendações de saúde, que são de redução da ingestão de sódio, assim sendo, duas foram as estratégias para

se avaliar a possibilidade de redução de sódio, quais sejam, adição de sorbato de potássio e a substituição do cloreto de sódio por cloreto de potássio.

Os estudos onde se avaliou a adição de sorbato de potássio evidenciaram que este pode impactar a segurança da mortadela possibilitando o aumento da atividade de água sem comprometimento da segurança microbiológica em relação à germinação de esporos de *Clostridium sporogenes* PA3679, pois não foi evidenciada a germinação até 30 dias de armazenamento da mortadela com atividade de água de 0,96. Por outro lado, há estudos que evidenciaram sua ação carcinogênica quando usado em conjunto com nitrito de sódio, além do período de 30 dias ser incompatível com a vida útil necessária para a comercialização dessa mortadela que é distribuída em todo território brasileiro.

Quanto à redução do teor de sódio da mortadela de baixo custo, foi avaliada a segurança do produto quando se substitui o cloreto de sódio pelo cloreto de potássio e observou-se a germinação dos esporos, mesmo na atividade de água de 0,95. Estes resultados da maior importância ratificam a necessidade de se conduzir teste de desafio, caso esta alternativa seja proposta para a redução de sódio, mesmo que a substituição seja parcial, especialmente em produtos altamente dependentes da atividade de água para sua segurança, como é o caso da mortadela.

Finalizando, recomenda-se que outros agentes antibacterianos sejam avaliados na busca de alternativas para se reduzir o teor de sódio desta categoria de produto e que testes de desafio com *Clostridium botulinum* sejam realizados, para que se avalie a segurança baseada na produção de toxinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bradbury, M., Greenfield, P., Midgley, D., Li, D., Tran-Dinh, N., Vriesekoop, F., & Brown, J. L. (2012). Draft genome sequence of *Clostridium sporogenes* PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic *Clostridium botulinum*.

Brown, J. L., Tran-Dinh, N. & Chapman, B. (2012). *Clostridium sporogenes* PA 3679 and Its Uses in the Derivation of Thermal Processing Schedules for Low-Acid shelf stable Foods and as a Research Model for Proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection*, v. 75, n. 4, p. 779–792.

Diao, M. M., André, S. & Membré, J. M. (2014). Meta-analysis of Dvalues of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *International journal of food microbiology*, 174, 23–30.

ICMSF (2011) International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in food 8: Use of data for assessing process control and product acceptance*. Springer, NY.

Jaam, O. E., Fliss, I. & Aider, M. (2016). Application of electro-activated potassium acetate and potassium citrate solutions combined with moderate heat treatment on the inactivation of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v.33, p.483–488.

Khanipour, E., Flint, S. H., McCarthy, O. J., Golding, M., Palmer, J., Ratkowsky, D. A., ... & Tamplin, M. (2016). Modelling the combined effects of salt, sorbic acid and nisin on the probability of growth of *Clostridium sporogenes* in a controlled environment (nutrient broth). *Food Control*, 62, 32-43.

Glass, K., & Marshall, K. (2013). *Clostridium botulinum*. In *Foodborne Infections and Intoxications* (pp. 371-387). Academic Press.

Morris, C., Labarre, C., Koliandris, A. L., Hewson, L., Wolf, B., Taylor, A. J., & Hort, J. (2010). Effect of pulsed delivery and bouillon base on saltiness and bitterness perceptions of salt delivery profiles partially substituted with KCl. *Food Quality and Preference*, 21(5), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.01.002>.

Taylor, R. H., Dunn, M. L., Ogden, L. V., Jefferies, L. K., Eggett, D. L., & Steele, F. M. (2013). Conditions associated with *Clostridium sporogenes* growth as a surrogate for *Clostridium botulinum* in nonthermally processed canned butter. *Journal of dairy science*, 96(5), 2754-2764.