

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE**  
**ALIMENTOS**

**LETÍCIA BUZATTO**

**CONSERVAÇÃO DE LINGUIÇA TIPO CALABRESA POR TEMPERATURA DE**  
**ARMAZENAGEM E TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NA SUPERFÍCIE DOS**  
**GOMOS, COM IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ÁCIDO**  
**LÁTICAS**

**PINHALZINHO, SC**

**2022**

**LETÍCIA BUZATTO**

**CONSERVAÇÃO DE LINGUIÇA TIPO CALABRESA POR TEMPERATURA DE  
ARMAZENAGEM E TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NA SUPERFÍCIE DOS  
GOMOS, COM IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ÁCIDO  
LÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Otimização de Tecnologias e Processos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Cleuzir da Luz.

Coorientadora: Profa. Dra. Denise Nunes Araujo.

**PINHALZINHO, SC**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial CEO/UEDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Buzatto, Leticia

CONSERVAÇÃO DE LINGUIÇA TIPO CALABRESA POR  
TEMPERATURA DE ARMAZENAGEM E TRATAMENTO  
ANTIMICROBIANO NA SUPERFÍCIE DOS GOMOS, COM  
IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ÁCIDO  
LÁTICAS / Leticia Buzatto. – 2022.

98 p.

Orientador: Cleuzir da Luz

Coorientadora: Denise Nunes Araujo

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, Chapecó, 2022.

1. Antimicrobianos. 2. Bactérias Ácido Láticas. 3. Linguça  
Tipo Calabresa . 4. Vida Útil. 5. Tratamento de Superfície. . I.  
da Luz, Cleuzir . II. Nunes Araujo, Denise. III. Universidade do  
Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do  
Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia

## LETÍCIA BUZATTO

### CONSERVAÇÃO DE LINGUIÇA TIPO CALABRESA POR TEMPERATURA DE ARMAZENAGEM E TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NA SUPERFÍCIE DOS GOMOS, COM IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Otimização de Tecnologias e Processos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

#### BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Cleuzir da Luz – Orientador  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Profa. Dra. Denise Nunes Araujo – Coorientadora  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membros:



Profa. Dra. Liziane Schittler Moroni  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC



Profa. Dra. Fabiane Bach  
Universidade Estadual do Mato Grosso do SUL – UEMS

Pinhalzinho, 03 de Junho de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao dia que DEUS colocou em meu coração uma aflição que me fez ir em busca de “algo a mais”. Enquanto satisfeitos, nada fazemos. Quando insatisfeitos, temos a oportunidade de evoluir e crescer.

Agradeço à família... meu orgulhoso pai Nilton, minha doce e dedicada mãe Anabel, minha inspiração irmã Fabíola, meu “amigo-irmão” Raphael e meus amados garotinhos Eduardo e Lucas, pela compreensão frente as constantes ausências. Pelas oportunidades que me proporcionaram e todos os esforços a mim dedicados e que possibilitaram minha chegada até aqui. Sem vocês, eu NADA seria!

Agradeço ao Roger, meu grande amor e maior incentivador desta conquista, pelo encorajamento nos momentos de dificuldade.

Agradeço as pessoas de bem que encontrei no caminho, doutor Afonso e doutora Fabiana, pela presteza e contribuição. Jamais os esquecerei, sem sequer conhecê-los.

Agradeço as professoras Denise e Damir (que mulheres fantásticas!) e toda equipe do LABMIM.

Por fim, agradeço ao meu orientador, professor Cleuzir, e à UDESC, universidade onde me sinto em casa, afinal, foi sempre nela, desde o início.

“Daqui um ano, você vai desejar ter começado hoje.”  
Karen Lamb.

## RESUMO

Cada vez mais empresas produtoras de alimentos buscam alternativas para retardar a deterioração de seus produtos. A deterioração é um processo natural influenciado por diversos fatores ambientais, biológicos e relacionados com a própria composição do alimento. Dessa forma, o estudo em questão objetiva identificar e avaliar a multiplicação das bactérias ácido lácticas, principal grupo relacionado à deterioração de industrializados cárneos, frente a diferentes condições de temperatura e tratamentos, usufruindo deste conhecimento para aplicação na conservação da linguiça tipo calabresa elaborada em escala industrial. Especificamente, minimizar os impactos da deterioração provocados pelas bactérias ácido lácticas em linguiça tipo calabresa já tratadas termicamente, quando aplicado diferentes componentes antimicrobianos combinados, diretamente na superfície dos gomos deste produto. Ajustados aos preceitos atuais de busca por alimentação mais saudável, propõe-se soluções de fumaça líquida combinada com os ácidos láctico e propiônico, nisina, nisina com diacetato de sódio e os extratos cítrico e de alecrim, além de óleo de soja, combinado com óleo de coco, agregando valor e confiabilidade ao produto. Para isso, a sensibilidade das bactérias ácido lácticas, isoladas diretamente da linguiça tipo calabresa, frente aos agentes antimicrobianos testados, foi determinada pelas técnicas de concentração inibitória mínima e de disco-difusão. Dentre os quatro diferentes tratamentos testados, a solução identificada como recomendada consiste naquela composta por fumaça líquida e os ácidos láctico e propiônico, sendo que seu efeito não foi alterado frente as diferentes condições de temperatura as quais a linguiça tipo calabresa foi submetida durante sua estocagem, representando uma possibilidade promissora para unidades industrializadoras de alimentos e para alimentos comercializados em temperatura ambiente. A refrigeração isoladamente mostrou atender a demanda de conservação, porém, sabe-se que a aplicação de frio na cadeia desta categoria de alimento, pós distribuição, não se enquadra na realidade atual do mercado, limitando as ações pelas empresas industrializadoras. A aplicação da solução recomendada, sem combinar o uso da temperatura de refrigeração, também se mostrou eficaz no controle da multiplicação das bactérias ácido lácticas e manutenção das características sensoriais aparentes do produto durante todo o período avaliado, correspondendo a 116,7% do período de vida útil atual deste

alimento, o que contribuiria para redução de reclamações de clientes, de desperdícios e de recursos financeiros para as unidades industrializadoras.

**Palavras-chave:**

Antimicrobianos, Bactérias Ácido Láticas, Linguiça Tipo Calabresa, Vida Útil, Tratamento de Superfície.

## ABSTRACT

Nowadays most food producing companies are looking for intending to find ways to delay the deterioration of their products. Spoilage is a natural process influenced by several environmental and biological factors, and by food composition. Thus, this study aims to identify and evaluate the multiplication of lactic acid bacteria, which is the main group related to the spoilage of packed meat foods, under different temperature and treatment conditions, using this taking knowledge as an advantage to be applied in the prevention of sausage spoilage in industrial scale. Specifically, to minimize the effects caused by lactic acid bacteria in cooked sausages, when different substances antimicrobials are applied on the surface of the buds. According to the current practices to looking forward to produce healthier food, hereby are presented the following potential solutions to this issue, such as: liquid smoke with lactic acid and propionic acid, nisin, nisin with sodium diacetate, citrus and rosemary extracts, plus soy oil, combined with coconut oil, in order to add value and reliability to the product. For that, the sensitivity of the lactic acid bacteria, isolated to the sausage, against the antimicrobial chemicals tested, is determined by the minimum inhibitory concentration and disk-diffusion techniques. Among the four different treatments tested, the recommended solution is composed of liquid smoke, natural smoke aroma, lactic acid, and propionic acid, and the effect it is not undermined by the different temperature conditions, with the sausage was submitted during its storage, representing an enhanced alternative for packed meat companies and for other foods which can be left out at room temperature. Refrigeration only proved to meet the demand for food preservation. However, it is known that the application of cold chain required on this food category, after distribution, does not fit the current reality of the market, limiting the actions by packed food companies. The application of the recommended chemical solution, without combining the refrigeration process, proved to be effective in controlling the multiplication of lactic acid bacteria and maintaining the apparent sensory characteristics of the sausage until all evaluated time course, resulting up to 116.7% of the current shelf-life of the product. This can contribute to the reduction of customer complaints, food waste and unnecessary financial resources for the companies.

**Key-words:**

Antimicrobials, Lactic Acid Bacteria, Cooked Sausage, Shelf-life, Surface Treatment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Curva Padrão da Multiplicação Bacteriana.....	22
Figura 2 - Etapas de Desenvolvimento do Estudo. ....	37
Figura 3 - Distribuição dos Tratamentos na Placa de ELISA.....	40
Figura 4 - Distribuição dos Discos Contendo Tratamento Antimicrobiano nas Placas de Petri .....	42
Figura 5 - Características das Colônias de BAL Obtidas das Amostras de Linguiça Tipo Calabresa aos 15 Dias de Fabricação.....	47
Figura 6 - Características das Colônias de BAL Obtidas das Amostras Controle de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de 25°C +/-1, aos 90 Dias de Fabricação. ....	47
Figura 7 - Características das Colônias de BAL Obtidas das Amostras Tratadas e Controle de Linguíça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de até 8°C e Amostras Tratadas, Mantidas em Temperatura de 25°C +/- 1, aos 90 Dias de Fabricação (Não Houve Desenvolvimento). ....	48
Figura 8 - CIM Tratamento 1 (Meio Mueller-Hilton X Caldo MRS).....	56
Figura 9 - Disco-Difusão Tratamento 1. ....	57
Figura 10 - CIM Tratamento 2 (Meio Mueller-Hilton X Caldo MRS).....	58
Figura 11 - Disco-Difusão Tratamento 2. ....	58
Figura 12 - CIM Tratamento 3 (Meio Mueller-Hilton X Caldo MRS).....	59
Figura 13 - Disco-Difusão Tratamento 3. ....	60
Figura 14 - CIM Tratamento 4 (Meio Mueller-Hilton X Caldo MRS).....	60
Figura 15 - Disco-Difusão Tratamento 4. ....	61
Figura 16 - Superfície Íntegra – Amostras Controle de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de até 8°C.....	65
Figura 17 - Formação de Slime – Amostras Controle de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de 25°C +/-1.....	68
Figura 18 - Comparativo da Textura Apresentada Pelas Amostras de Linguiça Tipo Calabresa, aos 60 Dias de Fabricação.....	69
Figura 19 - Superfície Íntegra – Amostras Tratadas de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de 25°C +/-1 ....	71
Figura 20 - Superfície Íntegra – Amostras Tratadas de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de até 8°C.....	73
Figura 21 - Curva de Multiplicação de Bactérias Ácido Lácticas pelo Tempo. ....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenciação dos Principais Gêneros de Bactérias Ácido Láticas.....	24
Tabela 2 - Composição dos Tratamentos Testados.....	30
Tabela 3 - Comparativo da Identificação em Sistema MALDI-TOF das Espécies de Bactérias Ácido Láticas Presentes na Linguiça Tipo Calabresa no Início (15 Dias de Fabricação) e ao Final (90 Dias de Fabricação) do seu Período de Vida Útil.....	48
Tabela 4 - Comparativo do Resultado das Metodologias CIM (em Duplicata) e Disco-Difusão (em Triplicata), Frente aos Quatro Diferentes Tratamentos Testados. ....	55
Tabela 5 - Comparativo Quinzenal da Média da Contagem de Bactérias Ácido Láticas (BAL) e Mesófilos Totais Entre as Amostras Tratadas e Amostras Controle, nas Diferentes Condições de Temperatura de Armazenagem (até 8°C e 25°C +/-1).....	63
Tabela 6 - Comparativo do Comportamento Físico-Químico Quinzenal Entre as Amostras Tratadas e Amostras Controle de Linguiça Tipo Calabresa, nas Diferentes Condições de Temperatura de Armazenagem (até 8°C e 25°C +/-1). ....	77
Tabela 7 - Análise de Variância: pH.....	78
Tabela 8 - pH (Controle X Tratamento).....	78
Tabela 9 - pH (Temperatura 8°C X Temperatura 25°C) .....	79
Tabela 10 - Análise de Variância: Aw .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APPCC	Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle
Aw	Atividade de Água
BAL	Bactéria Ácido Láctica
CIM	Concentração Inibitória Mínima
°C	Graus Celsius
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
cm <sup>2</sup>	Centímetro Quadrado
CMS	Carne Mecanicamente Separada
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	Gramas
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
l	Litros
log	Logaritmo
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MRS	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
TSA	Ágar Trypticase de Soja
UFC	Unidade Formadora de Colônia
SIF	Serviço de Inspeção Federal
µg	Microgramas
µl	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1 CONSUMO DE PRODUTOS CÁRNEOS .....	18
3.2 DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS.....	19
3.2.1 <i>Modelo Matemático da Multiplicação Bacteriana</i> .....	22
3.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM PRODUTOS CÁRNEOS.....	23
3.3.1 <i>Identificação das Bactérias Ácido Láticas por MALDI-TOF</i> .....	27
3.4 A LINGUIÇA TIPO CALABRESA E SEUS REQUISITOS LEGAIS .....	28
3.5 TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE EM LINGUIÇAS TIPO CALABRESA .....	28
3.6 PROPRIEDADES DOS COMPONENTES ANTIMICROBIANOS TESTADOS.....	30
3.6.1 <i>Fumaça Líquida e Aroma Natural de Fumaça</i> .....	31
3.6.2 <i>Ácidos Orgânicos</i> .....	32
3.6.3 <i>Nisina</i> .....	33
3.6.4 <i>Diacetato de Sódio</i> .....	35
3.6.5 <i>Extratos</i> .....	35
3.6.6 <i>Óleo de Coco</i> .....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE LINGUIÇA TIPO CALABRESA .....	38
4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO .....	39
4.2.1 <i>Concentração Inibitória Mínima</i> .....	39
4.2.2 <i>Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão</i> .....	41
4.3 APLICAÇÃO DO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NA LINGUIÇA TIPO CALABRESA EM FÁBRICA.....	42
4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA LINGUIÇA TIPO CALABRESA.....	43
4.4.1 <i>Contagem de Bactérias Ácido Láticas</i> .....	44
4.4.2 <i>Contagem de Mesófilos Totais</i> .....	44

4.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA LINGUIÇA TIPO CALABRESA.....	44
4.5.1 Atividade de Água – $A_w$ .....	44
4.5.2 Potencial Hidrogeniônico – pH .....	45
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
4.7 MODELAGEM MATEMÁTICA.....	45
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICAS (BAL) NAS AMOSTRAS DE LINGUIÇA TIPO CALABRESA.....	46
5.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO FRENTE AOS TRATAMENTOS TESTADOS .....	54
5.3 COMPORTAMENTO MICROBIOLÓGICO .....	62
5.3.1 Curva de Multiplicação das Bactérias Ácido Láticas.....	74
5.4 COMPORTAMENTO FÍSICO-QUÍMICO .....	76
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>93</b>
<b>IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS – 15 DIAS DE FABRICAÇÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS – 90 DIAS DE FABRICAÇÃO .....</b>	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O tempo de vida útil de um alimento é o tempo compreendido entre a sua produção e todo o período que este apresenta condições satisfatórias e seguras ao seu consumo, desde que armazenado conforme as condições estipuladas pelo fabricante. É definido como o tempo em que o produto pode ser armazenado, sem que comprometa suas características sensoriais, estando apto para o consumo humano (SILVA *et al.*, 2020).

Durante todo o período de validade devem ser asseguradas as características nutricionais dos seus componentes, o produto deve permanecer seguro, sem a possibilidade de gerar infecções ou intoxicações alimentares ocasionadas por micro-organismos patogênicos ou toxinas (bacterianas ou fúngicas). Além disso, deve manter suas características sensoriais (de textura, cor, odor e sabor), sem apresentar deterioração, o que o tornaria inapropriado para o consumo. Para a definição deste período são considerados fatores intrínsecos (quando relacionados com as características próprias do alimento) e os fatores extrínsecos (quando relacionados com o ambiente no qual o alimento se encontra), além do modo de obtenção e processo produtivo do item em questão (ANVISA, 2018).

A deterioração envolve qualquer alteração no alimento que o torne impróprio para o consumo. Entre os principais fatores de alteração dos alimentos e, conseqüentemente, do período de vida útil, destacam-se os metabólitos produzidos pelos micro-organismos presentes no alimento, responsáveis por provocar alterações sensoriais indesejadas, caracterizadas pelo processo de deterioração. Com o avanço desta degradação surgem alterações na coloração do produto por processo de oxidação, formação de limosidade na superfície pela produção de polissacarídeos extracelulares, comprometimento da estrutura e mudança da textura devido a protease e degradação de matrizes poliméricas, formação de gases e odores desagradáveis pela produção de compostos voláteis e formação de exsudatos pela hidrólise de substratos e liberação de água. Os produtos cárneos embalados a vácuo, como é o caso das linguiças cozidas, estão em condição de anaerobiose, contribuindo para o processo de degradação causado pela multiplicação de bactérias ácido lácticas, que desenvolvem alterações sensoriais (sabor azedo, descoloração, produção de gás

e formação de limo), comprometendo o período de vida útil definido pelo fabricante (ANVISA, 2018).

Uma prática comum nos mercados de produtos cárneos industrializados e embalados à vácuo é a realização da distribuição e armazenamento em temperatura ambiente. Visto a ampla faixa de temperatura a qual o produto acaba sendo submetido, se inicia o aparecimento de sinais de deterioração e a redução no período de vida útil (BORTOLOTTO *et al.*, 2021). Dessa forma, o desenvolvimento de tecnologias e alternativas para obtenção de alimentos quimicamente e biologicamente estáveis e seguros, bem como o prolongamento da vida útil de produtos perecíveis é um aspecto extremamente relevante para a indústria de alimentos contribuindo para fomentar as vendas, reduzir desperdícios, alcançar a satisfação dos consumidores e a fidelização de clientes. Além de evitar prejuízos pela ocorrência de desvios e necessidade de ressarcimento ou recolhimento de produtos pelo não atendimento da qualidade proposta.

Para ampliar a vida útil de um produto são utilizados diferentes métodos de conservação que retardam a degradação como por exemplo, o cozimento, resfriamento ou congelamento, secagem, acidificação, fermentação, ou ainda, o uso de conservantes (VENCATO *et al.*, 2020).

Os conservantes são classificados entre naturais e artificiais, sendo que os conservantes artificiais cada vez mais tem seu uso questionado devido os potenciais riscos à saúde. Alguns conservantes naturais amplamente utilizados, como o sal e o açúcar, também podem agravar problemas de saúde como a hipertensão e diabetes, criando-se um interesse pela busca de alternativas mais saudáveis (VENCATO *et al.*, 2020).

A industrialização da carne é um método utilizado desde os primórdios para sua conservação. Dentre os embutidos cárneos a linguiça tipo calabresa se destaca devido sua ampla utilização em pratos como pizza, feijoada, sanduíches e ao seu rápido preparo, por se tratar de produto previamente cozido (LUCINI *et al.*, 2009; BORTOLOTTO *et al.*, 2021).

Na literatura, o número de estudos que abordam a conservação de linguiças tipo calabresa por meio da adição de ingredientes e aditivos na massa durante a elaboração sobressai àqueles que o fazem por outros métodos, como é o caso das aplicações superficiais de antimicrobianos. A aplicação superficial configura uma

alternativa promissora por atuar diretamente na área de contato com os micro-organismos deteriorantes, agregados após etapa de cozimento.

A fundamentação e embasamento adquiridos com este estudo poderão conduzir as ações implantadas pelas indústrias produtoras de linguiça tipo calabresa, contribuindo com a melhoria na qualidade do produto ofertado e o crescimento da empresa.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

O processo de deterioração de produtos cárneos segue uma combinação de eventos biológicos e químicos complexos causados por diferentes populações bacterianas, sendo que as bactérias ácido lácticas têm sido apontadas como principais responsáveis pela deterioração e perda de qualidade das linguiças cozidas tipo calabresa. Devido ao seu caráter fermentativo e deteriorante essas bactérias interferem nas características sensoriais do produto, conferindo odor e sabor azedo, além de aparência limosa à superfície.

Diferentes estudos são realizados objetivando a conservação das linguiças cozidas por meio de adição de ingredientes na massa, durante sua elaboração. Porém, conforme citado por Rivas *et al.* (2018), o uso de metodologias que atuem na superfície de produtos à base de carne podem apresentar resultado mais eficaz. Isto se justifica pela prioridade de localização da principal microbiota envolvida na deterioração destes produtos, além de que a aplicação em contato direto com a superfície do alimento requer quantidade menor de antimicrobiano do que através do uso em massa, reduzindo os custos de processamento.

A identificação de métodos que sejam eficazes na desaceleração da multiplicação das bactérias ácido lácticas e redução da vulnerabilidade do produto durante seu período de vida útil é imperativo para as empresas produtoras de alimentos perecíveis, sobretudo quando aliados a otimização dos recursos, resultando em expressivos ganhos econômicos e de qualidade ao produto.

## 2 OBJETIVOS

Esta pesquisa se constitui dos seguintes objetivos:

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar quais as espécies das bactérias ácido lácticas atuantes em linguiça tipo calabresa, quando submetidas a diferentes condições de temperatura e de tratamento antimicrobiano aplicado na superfície dos gomos, a fim de retardar a deterioração deste alimento.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar quais as bactérias ácido lácticas presentes na linguiça tipo calabresa, no início e ao final da vida útil deste alimento;
- Avaliar a interferência de diferentes tratamentos antimicrobianos (fumaça líquida, ácido láctico e ácido propiônico; nisina; nisina, diacetato de sódio, extrato cítrico e extrato de alecrim; e óleo de soja e de coco) no crescimento *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de linguiça tipo calabresa;
- Aplicar na indústria o tratamento antimicrobiano de melhor resultado identificado *in vitro*, com aplicação na superfície dos gomos da linguiça tipo calabresa, checando a multiplicação das bactérias ácido lácticas durante o período de vida útil deste alimento;
- Determinar a influência da temperatura de refrigeração (até 8°C) e ambiente (25°C +/-1) no desenvolvimento das bactérias ácido lácticas em linguiça tipo calabresa, elaboradas em ambiente industrial, com e sem aplicação de tratamento na superfície dos gomos, durante o período de vida útil deste alimento;
- Corroborar o modelo matemático que descreve a multiplicação das bactérias ácido lácticas em linguiça tipo calabresa, para estimar a vida útil deste produto.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CONSUMO DE PRODUTOS CÁRNEOS

O aumento da população mundial demanda maior consumo de proteínas de origem animal, conseqüentemente o consumo de carne aumentou, já que é parte significativa da dieta das pessoas (CHENG *et al.*, 2018). A carne suína é uma das carnes mais populares do mundo e responde por cerca de 35% da produção mundial. Dados da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) demonstram que nos últimos cinco anos o consumo médio anual de carne suína chegou a 110 milhões de toneladas. A produção mundial em 2020 foi de 102,95 milhões de toneladas, dessas o Brasil produziu 4,25 milhões e é o quarto maior produtor de carne suína do mundo com 1.970.611 matrizes alojadas, sendo 77% da produção destinada para o mercado interno e 23% para exportação, o que representa 1,024 milhão de toneladas exportadas e um aumento de 36,53% em relação a 2018. O estado de Santa Catarina é destaque na produção de alimentos, principalmente de proteínas de origem animal, sendo o responsável por 27,15% da produção brasileira de carne suína e 14,5% da carne de frango, em 2019 (EMBRAPA, 2021). Mudanças e melhorias nas organizações, bem como o contínuo incremento tecnológico contribuem para o bom desempenho do país (EMBRAPA, 2020).

Gerar e sustentar vantagens competitivas são fundamentais para a sobrevivência de empresas produtoras e processadoras de carne e produtos cárneos. A elaboração de produtos diferenciados, de menor custo, desenvolvendo estratégias inovadoras para inserção e expansão de mercados, além de novos modelos de negócios estão entre os principais desafios a serem enfrentados e estratégias a serem seguidas para o alcance desses objetivos (RAIMUNDO; BATALHA, 2015).

Com a finalidade de atender à demanda dos consumidores, em associação ao crescimento da população urbana brasileira, mudanças importantes no padrão da alimentação vêm se destacando, como a redução do consumo de alimentos que demandem mais tempo para o seu preparo e o aumento do consumo de alimentos previamente elaborados (SCHLINDWEIN; KASSOUF, 2006).

O aumento da demanda de alimentos, principalmente no que se refere a carne de aves e de suínos, faz com que as indústrias invistam cada vez mais em tecnologias,

buscando atrativo diferencial e agregação de valor aos produtos oferecidos. A industrialização é a principal alternativa para o destino da matéria prima após remoção dos cortes mais nobres, além de proporcionar um maior período de vida útil aos produtos. Atualmente, o consumidor tem à sua disposição ampla variedade de derivados cárneos industrializados, como presuntos, apresuntados, linguiças, salsichas, mortadelas, salames, empanados, entre outros (ORSOLIN *et al.*, 2015).

A indústria de alimentos deve estar sintonizada com o interesse dos consumidores, conhecer a aceitabilidade dos seus produtos no mercado e o que os torna melhores do que os oferecidos pela concorrência. Além de representar um dos maiores produtores mundiais de carne crua fresca e congelada (bovina, suína e de aves), o Brasil tem investido na indústria processadora de carne fermentada, cozida e seca (salames, salsichas, hambúrgueres, *nuggets*, presunto, etc.), atendendo a procura por alimentos de fácil preparo (CAVALHEIRO *et al.*, 2020).

O aumento do consumo de alimentos pré-preparados e de maior valor agregado, possibilitado tanto por melhorias na renda da população, quanto por oscilações de mercado que habitualmente envolvem e condicionam a exportação de carnes, implicam em uma relevância incontestável no desenvolvimento do mercado interno de carnes em geral e particularmente da carne suína. Desenvolver e sustentar uma forte demanda interna aumenta a segurança e estabilidade do setor frente às instabilidades do mercado externo (RAIMUNDO; BATALHA, 2015).

O mercado de produtos à base de carne embutida vem crescendo continuamente. Esses produtos representam um percentual importante da alimentação da população brasileira e a linguiça constitui o produto cárneo embutido mais produzidos e mais vendido no país. O seu baixo custo para elaboração facilita a aquisição por todos os segmentos da população e do mercado varejista. Além da carne como matéria-prima básica, a formulação da linguiça contém gordura e o sal como fonte de sódio (MAIA JUNIOR *et al.*, 2020).

### 3.2 DETERIORAÇÃO DE PRODUTOS CÁRNEOS

Os alimentos são compostos por uma mistura de muitas substâncias químicas diferentes, as quais afetam e interferem no seu período de vida útil. Há uma série de efeitos químicos e físicos que, isoladamente e em combinação, podem afetar este

período de um alimento. Estas interações ocorrem naturalmente durante a manipulação e no período de armazenamento dos alimentos, sendo que as mudanças em produtos mais processados, como é o caso das linguiças cozidas, ocorrem em dias ou semanas (ANVISA, 2018).

As propriedades físicas e químicas dos alimentos determinam seu grau de susceptibilidade à atividade microbiana. Quando relacionada à deterioração, um alimento pode ser perecível, como é o caso dos alimentos frescos, semiperecível, para vegetais como batatas e nozes, ou ainda, classificados como estáveis ou não perecíveis, como é o caso da farinha e açúcar (MADIGAN *et al.*, 2010).

Devido sua composição e características, a carne e os produtos à base de carne são altamente perecíveis, requerendo cuidados especiais durante todas as operações para minimizar a deterioração e prolongar sua vida útil. O período de vida útil da carne está diretamente relacionado com a contagem bacteriana primária e ao tipo de bactéria inicialmente presente, além da possibilidade de recontaminação após processamento no caso de industrializados, ou ainda das condições ao qual o produto foi submetido durante seu armazenamento, como temperatura, pH, luminosidade e atmosfera (RUSSO *et al.*, 2006).

A carne e seus produtos derivados apresentam alta susceptibilidade a contaminações bacterianas, alterando suas características organolépticas, provocando redução de suas propriedades nutricionais e até mesmo risco à saúde do consumidor podendo veicular micro-organismos patogênicos ou toxinas (HUGAS, 1998).

Os micro-organismos deteriorantes de carne representam apenas uma fração da microbiota inicial, e que em decorrência das condições de armazenamento, acabam se tornando predominante. Apesar de sua microbiota bastante diversificada, os micro-organismos mais comumente encontrado em carnes correspondem a mesófilos aeróbios totais como *Pseudomonas* spp., bactérias ácido lácticas como *Brochothrix thermosphacta*, *Flavobacterium* spp., bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *micrococos* e *estafilococos* (SARAIVA, 2008).

Alimentos deteriorados são aqueles que possuem sabor e odor já desagradáveis, sendo muitas vezes originados da proliferação de micro-organismos indesejáveis produtores de compostos voláteis durante o seu metabolismo, os quais são detectados e identificados pelo olfato e paladar humano. De modo geral, a

degradação dos alimentos envolve qualquer alteração que torne o alimento inadequado para o consumo. As carnes e os produtos cárneos, em especial, são meios nutritivos ideais para micro-organismos patogênicos e deteriorantes (GEITENES *et al.*, 2013).

As características sensoriais como sabor, maciez, cor e odor influenciam diretamente na percepção da qualidade da carne pelos consumidores (EECKHAUT *et al.*, 2012).

Segundo Bandeira (2004), o odor e o sabor desagradáveis, azedo, ocorrem normalmente como consequência do acúmulo de ácidos orgânicos que se formam durante a degradação enzimática de moléculas bacterianas complexas. Essas alterações são resultante da produção anaeróbia de ácidos graxos ou ácido láctico, ocasionadas pela ação bacteriana e, também, como consequência da proteólise, produzida por bactérias aeróbias facultativas ou anaeróbias (*apud* ALCANTARA; CRISTINA; MORAIS, 2012).

Por ser de fácil percepção, a cor e o odor são as duas características principais da carne que afetam o comportamento dos consumidores. A descoloração e o esverdeamento tem sido descritos na literatura como resultante do ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) produzido pela conversão da mioglobina a sulfomioglobina, por bactérias do tipo anaeróbias (EECKHAUT *et al.*, 2012).

O potencial de degradação de um micro-organismo é determinado por sua capacidade de produzir os metabólitos que estão associados à deterioração dos alimentos (POTHAKOS *et al.*, 2015).

A deterioração é definida pelo reconhecimento e interpretação de estímulos sensoriais desagradáveis e, portanto, sujeitos à percepção humana individualizada. Porém, está ainda correlacionada com limiares microbiológicos, concentrações químicas e padrões da microbiota existente (POTHAKOS *et al.*, 2015).

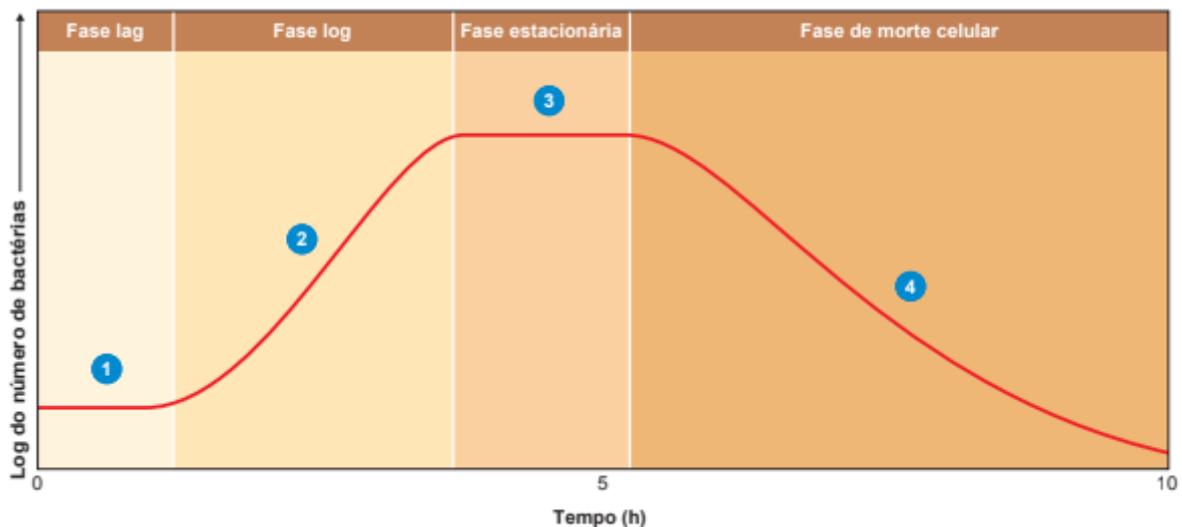
Um aspecto importante que deve ser considerado é o limiar populacional necessário para provocar e comprometer as alterações sensoriais nos produtos. Apesar de não existir uma relação direta e clara entre o número de micro-organismos presentes em um alimento e os efeitos resultantes nas características sensoriais, além da própria variação que ocorre para as diferentes categorias de alimentos, a população de micro-organismos e os defeitos encontrados em produtos deteriorados geralmente apresentam correlação. A literatura recomenda que contagens totais de

micro-organismos não excedam  $10^5$  UFC/g ou ml de produto. Deterioração microbiana em carnes processadas não é observada em populações menores que  $10^6$  UFC/g ou  $\text{cm}^2$ . Para contagens entre  $10^6$  e  $10^7$  as carnes embaladas a vácuo podem estar no limite de deterioração, com odores e outras alterações já sendo perceptíveis (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

### 3.2.1 Modelo Matemático da Multiplicação Bacteriana

Embora a legislação brasileira não estabeleça padrão para micro-organismos deteriorantes, conforme comentado anteriormente, o nível populacional bacteriano pode estar relacionado com as características de deterioração dos alimentos. Comumente, a multiplicação populacional segue uma curva padrão, conforme citado por Tortora, Funke e Case (2012), exemplificado na figura 1, abaixo.

Figura 1 – Curva Padrão da Multiplicação Bacteriana.



Fonte: Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., 2012.

Nesta curva, a fase *lag* é identificada como a fase em que há pouca ou nenhuma multiplicação das células, sendo o período em que ocorre o preparo celular e a adaptação ao meio. Em seguida, na fase *log*, há uma multiplicação exponencial da população bacteriana, onde o tempo de geração é constante. Em decorrência das alterações do ambiente, depleção de nutrientes e acúmulo de produtos residuais, a população entra em uma fase estacionária e se mantém uniforme, já que a multiplicação é compensada pela morte microbiana em proporção semelhante. Por

fim, na fase de declínio, a taxa de mortalidade supera a de multiplicação, resultando num caimento acentuado da curva e acúmulo de detritos celulares no meio (FORSYTHE; HAYES, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A multiplicação bacteriana na fase exponencial ocorre em progressão geométrica, de base 2, podendo ser expressa pelas equações:

$$N = N_0 2^n \quad (1)$$

$$g = t/n \quad (2)$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2 \quad (3)$$

$$n = 3,3(\log N - \log N_0) \quad (4)$$

Em que:

N= número de células no tempo t;

N<sub>0</sub>= número de células no tempo t<sub>0</sub>;

n= número de gerações formadas durante o período de multiplicação exponencial;

g= tempo de geração da população celular;

t= tempo em horas ou minutos em que a cultura apresenta uma taxa de multiplicação exponencial.

Então, conhecendo-se os parâmetros “N” e “N<sub>0</sub>” na fase de multiplicação exponencial é possível calcular “n” e, a partir de “n” e do tempo “t”, o tempo de geração “g” (MURRAY *et al.*, 1992 *apud* ASSIS; VALADÃO; CISALPINO, 2011). A taxa de desenvolvimento é a constante “k”, esta constante é uma medida do número de gerações formadas, por unidade de tempo e é dada pela equação:

$$k = \ln 2/g \quad (5)$$

### 3.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM PRODUTOS CÁRNEOS

As bactérias ácido lácticas constituem um grupo de bactérias gram-positivas, com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Encontradas na forma de cocos ou bacilos, geralmente imóveis, não formadores de esporos e catalase negativa. São basicamente mesófilas (com algumas linhagens psicrótróficas), capazes de crescer em temperatura entre 5 e 45°C. Apesar de serem aerotolerantes, são bastante características de ambientes anaeróbios e capazes de suportar pH muito baixo. (POFFO; ADONAI, 2011; MILKPOINT, 2017).

Todas as bactérias ácido lácticas crescem anaerobiamente, porém, não são sensíveis ao oxigênio, podendo crescer em sua presença. Dessa forma, são classificadas como anaeróbias aerotolerantes. Uma diferença importante entre os subgrupos existentes está no produto formado a partir da fermentação de açúcares, composto do qual obtêm energia. O grupo denominado homofermentativo gera o ácido láctico como único produto da fermentação, enquanto o grupo denominado heterofermentativo, gera além do ácido láctico, outros produtos, como dióxido de carbono, etanol, lactato e outros flavorizantes como produto do seu metabolismo, sendo dispostos na Tabela 1 os principais gêneros envolvidos (MANDIGAN *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Diferenciação dos Principais Gêneros de Bactérias Ácido Lácticas.

Formato e arranjo celular	Gênero
<b>Cocos em cadeias ou tétrades</b>	
Homofermentativo	<i>Streptococcus</i>
	<i>Enterococcus</i>
	<i>Lactococcus</i>
	<i>Pediococcus</i>
Heterofermentativos	<i>Leuconostoc</i>
<b>Bacilos, normalmente em cadeias</b>	
Homofermentativo	<i>Lactobacillus</i>
Heterofermentativo	<i>Lactobacillus</i>

Fonte: Mandigan *et al.*, 2010.

Constituem um grupo formado por treze gêneros bacterianos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*, associados a plantas, carnes, leite e seus derivados. Muito empregadas intencionalmente na produção de alimentos, porém também podem ser responsáveis pela produção de sabores e aromas indesejáveis (EMBRAPA, 2011).

A fermentação do ácido láctico pode resultar na deterioração de alimentos cárneos. Em contrapartida, também pode contribuir para a produção de iogurte a partir

do leite, chucrute a partir do repolho e conservas de pepino (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As bactérias ácido lácticas sempre foram de grande importância para a indústria de alimentos. Os micro-organismos pertencentes a esse grupo são amplamente utilizados como culturas *starter*, alterando a matéria prima pela produção de ácidos e conferindo sabores e aromas específicos. Várias linhagens são conhecidas por terem características benéficas. Existem cepas utilizadas como probióticos, desempenhando um papel importante na melhoria do equilíbrio da microbiota nativa em humanos e outros animais. Outras, detêm a capacidade de produção de diferentes substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas, que podem auxiliar evitando a deterioração e a proliferação de patógenos de origem alimentar, contribuindo para a segurança do alimento (DE CASTILHO; NERO; TODOROV, 2019).

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos que diferem entre si quanto a composição de aminoácidos, biossíntese, transporte e modo de ação. Nos alimentos, as bacteriocinas podem ser originadas a partir da microbiota normal ou introduzida e apresentam efeito bactericida ou bacteriostático, interferindo na multiplicação de outras bactérias de espécies relacionadas. Vários estudos têm sido publicados, devido a aplicação das bacteriocinas com uso para proteção de alimentos, compondo uma alternativa a conservantes químicos tradicionais (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

Mesmo com a importante interferência benéfica de várias bactérias ácido lácticas na indústria de alimentos, os micro-organismos pertencentes a esse grupo podem determinar deterioração em produtos alimentícios e transportar vários genes relacionados à virulência e à resistência a antibióticos (DE CASTILHO; NERO; TODOROV, 2019).

Os produtos metabólicos das bactérias ácido lácticas são importantes na preservação dos alimentos. Entretanto, a multiplicação incontrolável de algumas espécies pode resultar na deterioração de carnes e produtos cárneos (HUGAS, 1998). De modo geral, as principais bactérias ácido lácticas deteriorantes identificadas em produtos cárneos, correspondem a *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Brochetrix thermosphacta* e *Pseudomonas* spp.

Devido às suas propriedades intrínsecas de atividade de água elevada, pH próximo à neutralidade e presença de nutrientes, a carne é altamente sensível a

deterioração microbiana. As bactérias ácido lácticas constituem uma parte da flora inicial das carnes que se desenvolve facilmente após o processamento de embutidos fermentados, mantidos sob refrigeração ou embalados a vácuo ou em atmosfera modificada (HUGAS, 1998).

As bactérias ácido lácticas compreendem o principal grupo deteriorante presente em produtos cárneos curados e cozidos, armazenados em temperaturas de refrigeração sob condições anaeróbicas, que envolvem embalagens com atmosfera modificada e embalagem a vácuo (SLONGO *et al.*, 2009). A multiplicação a níveis elevados destas bactérias nestes produtos pode acarretar mudanças sensoriais indesejáveis como o aparecimento de odores ácidos (BORCH; MERMANS; BLIXT, 1996).

A maior parte das bactérias é eliminadas com a aplicação de tratamento térmico em produtos cárneos cozidos (65-75°C). Porém, após o tratamento térmico, o alimento pode sofrer recontaminação provinda da exposição ao ambiente produtivo e a manipulação do produto. Devido a esta recontaminação as linguiças cozidas sofrem com o problema de deterioração superficial e alterações sensoriais, já que são conservadas em temperatura ambiente. As bactérias ácido lácticas têm sido apontadas como principais responsáveis pela deterioração de linguiças e salsichas cozidas embaladas a vácuo, caracterizando como principais defeitos sensoriais a fermentação, aroma e sabor azedo do alimento (FREIBERGER *et al.*, 2016).

Resultante da atividade de bactérias ácido láctica, são observadas alterações como sabor e odor ácido, redução do pH, exsudatos leitosos, produção de gás, estufamento da embalagem, descoloração ou esverdeamento. De qualquer modo, a deterioração causada por bactérias ácido lácticas é principalmente decorrente da produção de metabólitos que causam alterações indesejadas na aparência, textura e sabor do alimento (JAY, 2005; MASSAGUER, 2006; HU *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; AUDENAERT *et al.*, 2010 *apud* KALSCHNE *et al.*, 2015).

As bactérias ácido lácticas fermentam a glicose e outros substratos presentes na carne. Ao terem os substratos esgotados, a multiplicação para, normalmente quando a população atinge 8 log/cm<sup>2</sup>. Os resíduos metabólicos decorrentes da multiplicação bacteriana podem ser identificados como gostos levemente ácidos ou leitosos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A deterioração dos alimentos por estas bactérias é facilitada quando em alimentos refrigerados, onde as bactérias ácido lácticas psicotróficas têm uma vantagem considerável na taxa de multiplicação, comparada com outros agentes aeróbios e anaeróbios facultativos e as bactérias gram-negativas (SÄDE, 2011).

Conforme Labadie, (1999), Nychas *et al.*, (2008), Pothakos *et al.*, (2014), a combinação de técnicas para a preservação exerce uma pressão de seleção em relação aos micro-organismos anaeróbicos psicotróficos estritos ou facultativos, como é o caso de parte das bactérias ácido lácticas, pois a maioria dos micro-organismos aeróbios é inibido pelo CO<sub>2</sub> utilizado na composição da atmosfera modificada ou acumulado como resultado da atividade microbiana. Esta seleção ecológica, para Chaillou *et al.*, (2014), em relação as bactérias ácido lácticas resistentes ao frio, ao CO<sub>2</sub> e aerotolerantes manteve poucas espécies da microbiota da carne relacionada à deterioração, que dominam no final do período de vida útil de alimentos embalados e refrigerados. Assim, as bactérias ácido lácticas são o grupo ideal para se desenvolver independentemente do método de embalagem, enquanto sua ocorrência depende dos micro-organismos competitivos e da influência das condições de armazenamento (*apud* POTHAKOS *et al.*, 2015).

### **3.3.1 Identificação das Bactérias Ácido Lácticas por MALDI-TOF**

A espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção/ ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF), foi utilizada para a identificação das bactérias ácido lácticas deste estudo.

Este equipamento mede o tempo de voo em um tubo a vácuo, de partículas cristalizadas de uma amostra. Em um campo elétrico os íons são acelerados, promovendo a sua separação, o que permite mensurar este tempo e a massa exata das partículas dessorvidas. Com base nessa informação, um espectro característico é registrado e constitui uma impressão digital da amostra, que é única para uma determinada espécie. O software de computador compara automaticamente a leitura com um banco de dados de referência e fornece uma pontuação. O equipamento considera a identificação do isolado como “confiável a nível de espécie (cor verde)”, quando o *score* for maior ou igual a 2.00; “confiável a nível de gênero (cor amarela)”, quando o *score* for entre 1.70 e 1.99; ou “sem identificação possível (cor vermelha)”, quando o *score* for menor que 1.69 (WIESER *et al.*, 2012).

### 3.4 A LINGUIÇA TIPO CALABRESA E SEUS REQUISITOS LEGAIS

A linguiça calabresa e tipo calabresa representa importante parcela do mercado mundial de carnes industrializadas e processadas, sendo amplamente utilizada na dieta brasileira como ingrediente de pizzas, lanches e da tradicional feijoada (BORTOLOTTO *et al.*, 2021).

A linguiça é definida como o produto cárneo industrializado obtido a partir de matérias primas originadas de animais de açougue, adicionados ou não de gordura animal, contendo ingredientes, embutidas em envoltório que pode ser de origem natural ou artificial e submetida a processo de cozimento e/ou cura. A linguiça tipo calabresa tem o sabor picante como característica acentuada, sendo submetida ao processo de cozimento em estufa ou similar e tendo a defumação como uma etapa opcional. Por sua denominação “tipo” calabresa, é permitido o uso de até 20% de carne mecanicamente separada (CMS), desde que devidamente informados no rótulo (BRASIL, 2000).

Dentre os ingredientes obrigatórios estão a carne e o sal, enquanto gordura, água, proteína vegetal, açúcares, plasma, aditivos intencionais, aromas, especiarias e condimentos são de uso opcional. Para o embutimento podem ser utilizados envoltórios naturais ou artificiais, sendo permitido o uso de substâncias glaceantes para auxiliar na proteção, quando estas forem devidamente aprovadas pelos órgãos competentes.

As linguiças cozidas devem atender ao percentual máximo de 60% de umidade, 35% de gordura e 0,3% de cálcio (base seca), além de conter em sua formulação pelo menos 14% de proteína. Quanto aos requisitos microbiológicos, devem atender a legislação vigente (RDC n°331/2019 e IN n°60/2019).

### 3.5 TRATAMENTOS DE SUPERFÍCIE EM LINGUIÇAS TIPO CALABRESA

Produtos cárneos embutidos são fabricados e consumidos pelo homem desde a antiguidade devido a busca pela conservação deste alimento. Dentre estes produtos embutidos, as linguiças curadas cozidas ou cruas, são um dos alimentos mais populares consumidos em todo o mundo. Segundo Sarantópoulos *et al.* (2001) e

Wijnker *et al.* (2006), estes produtos fazem uso de envoltórios naturais (tripas), que correspondem à subcamada mucosa remanescente após a etapa de higienização de vísceras animais como estômago, intestino, trato urinário ou reto. Conforme relatado por Varnam & Sutherland (1998), apesar do desenvolvimento de envoltórios artificiais, os naturais continuam sendo amplamente aplicados devido suas vantagens como o fato de serem comestíveis, elásticos, moldáveis, naturais, além de permeáveis à água e à fumaça (*apud* LUCINI *et al.*, 2009)

Conforme relatado por Campos (2012), a disponibilidade de alimentos para suprir as necessidades e demandas da população, requer amplas redes de distribuição. Entretanto, para que esses produtos estejam aptos e disponíveis para comercialização, é necessário que sua durabilidade seja mantida. Para isso, as indústrias de alimentos fazem uso de aditivos objetivando o aumento do período de vida útil da maioria dos alimentos processados (*apud* SILVA *et al.*, 2015).

A indústria da carne tem se preocupado com a busca por fontes antioxidantes naturais, visando o crescente interesse dos consumidores e em resposta a alegações recentes de que os antioxidantes sintéticos têm potencial para causar efeitos toxicológicos (EL-NASHI *et al.*, 2015).

O uso de antioxidantes naturais na preservação de carnes já se mostrou promissor. Porém, há pouca informação sobre a eficácia do seu uso quando aplicado por pulverização (JENKO *et al.*, 2018). Ainda em seu estudo, Jenko *et al.* (2018), identificaram que extrato de alecrim poderia ser utilizado como antioxidante natural por pulverização em carne suína, reduzindo os valores de tbars quando comparado ao controle.

A conservação de produtos cárneos está relacionada ao emprego de especiarias geralmente com aplicação devido sua atividade bactericida ou bacteriostática. Para a preservação do alimento é fundamental o conhecimento sobre os micro-organismos que atuam sobre ele. Desse modo, para o controle da atuação de bactérias ácido lácticas em linguiças cozidas, é determinante o uso de conservantes que atuem na superfície do alimento (ou do envoltório), visto a localização deste micro-organismo após tratamento térmico (recontaminação).

Estudos têm mostrado que o uso de bacteriocinas quando aplicadas na superfície dos produtos cárneos, podendo ser por meio de pulverização, imersão ou adição dentro da embalagem é mais eficiente do que o uso da bacteriocina

diretamente como parte da formulação, na massa do produto durante sua elaboração (BARROS, KUNIGK e JURKIEWICZ, 2010; RIVAS CASTRO, VALLEJO, MARGUET e CAMPOS, 2014 *apud* RIVAS *et al.*, 2018). Essa aplicação de bacteriocinas de modo indireto, em materiais que fazem contato, ou na superfície do alimento, requer quantidades menores em comparação com a adição direta ao volume total de carne e isso contribui com a redução do volume de conservante e, conseqüentemente, dos custos de processamento (BALCIUNAS *et al.*, 2013).

### 3.6 PROPRIEDADES DOS COMPONENTES ANTIMICROBIANOS TESTADOS

Quando se fala em antimicrobianos não há apenas um conservante elencado como ideal, o que leva ao uso de misturas de produtos com essa finalidade, os chamados *blends*. O uso de *blends* amplia o espectro de ação e conseqüentemente de proteção ao alimento. Neste trabalho foram selecionados tratamentos com diferentes combinações de princípios, conforme descrito na tabela 2:

Tabela 2 - Composição dos Tratamentos Testados.

<b>Tratamento</b>	<b>Composição</b>
1	Fumaça líquida, aroma natural de fumaça, ácido láctico e ácido propiônico.
2	Nisina e aroma natural de fumaça.
3	Nisina, diacetato de sódio, extrato cítrico e extrato de alecrim.
4	Óleo de coco e aroma natural de fumaça.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Há um conhecimento prévio disponível em literatura a respeito da atividade antimicrobiana de princípios citados como a nisina e alguns ácidos orgânicos, porém as informações são voltadas geralmente a micro-organismos patogênicos, enquanto princípios como o óleo de coco e o diacetato de sódio, são de conhecimento mais restrito. Desse modo, percebeu-se uma oportunidade na pesquisa da ação destes antimicrobianos, frente a agentes deteriorantes.

### 3.6.1 Fumaça Líquida e Aroma Natural de Fumaça

A fumaça líquida, considerada como um antioxidante natural, é composta principalmente de ácidos orgânicos, carbonilas e fenóis. Os ácidos orgânicos são responsáveis pela aceleração de cura, fazem a regulação da acidez e possuem ação antimicrobiana. As carbonilas são responsáveis pela formação da cor de defumado. E os fenóis são os principais responsáveis pelo sabor característico de defumado, contendo também funções antimicrobianas e antioxidantes. Quando aplicada na superfície do produto, sendo por aspersão, imersão, borrifamento ou diretamente na embalagem, a fumaça líquida forma um filme em torno do alimento, contribuindo para a proteção contra os micro-organismos formadores de acidez externa ali presentes (FUCHS GEWÜRZE DO BRASIL LTDA, 2017).

Além de conferir textura, cor, sabor e apresentar ação antimicrobiana, o uso da fumaça líquida é facilitado por ter baixa dosagem de aplicação e reduzir etapas que envolvem manipuladores e equipamentos. O uso das fumaças líquidas e aromas de fumaça minimizam as chances de contaminação e proliferação bacteriana.

Embora a defumação seja um método antigo de conservação, o uso de fumaça líquida tem sido potencializado visto a tecnologia envolvida, garantindo maior higiene, menor tempo de processamento e menor poluição ambiental. Além destas vantagens, o uso de fumaça líquida garante maior uniformidade na cor, sabor e na deposição de substâncias antioxidantes e antimicrobianas nos produtos (FERNANDES *et al.*, 2014).

Souza *et al.* (2015), compararam o uso de diferentes técnicas de defumação na elaboração de almôndega a partir da filetagem de tilápia e identificou que os métodos de defumação a quente, assado em grelha e defumação com fumaça líquida, são similares no atendimento ao requisito microbiológico, resultando em um produto apto ao consumo humano. Desse modo, além de demonstrar a eficácia da fumaça líquida no fator microbiológico, concluiu que o uso deste método apresentou o melhor resultado nos quesitos sabor e percentual de proteína.

Resultado semelhante foi identificado por Fernandes *et al.* (2014), durante o preparo de hambúrguer e salsicha a partir de carne de jacaré, submetidos a defumação a quente, defumação líquida e sem defumação. A contagem microbiana de ambos os métodos de defumação atendeu aos requisitos vigentes em legislação para estes produtos, enquanto a defumação líquida apresentou maior aceitação sensorial.

### 3.6.2 Ácidos Orgânicos

Conforme citado por Surekha & Reddy (2000), ácidos orgânicos, como por exemplo o ácido acético, láctico, propiônico e sórbico, vêm sendo aplicados em alimentos com o objetivo de contribuir na conservação, já que muitos tem seu uso aprovado como aditivo alimentar e são dotados de atividade antibacteriana (*apud* GONZÁLEZ-FANDOS; HERRERA, 2013).

O ácido láctico e seus sais, lactato de sódio ou de potássio, atuam como agentes bacteriostáticos, reduzindo a taxa de multiplicação dos micro-organismos. Estes componentes agem sobre o metabolismo bacteriano fazendo a acidificação intracelular, interferindo na transferência de prótons entre a membrana e inibindo mecanismos essenciais ao desenvolvimento de patógenos.

Neste âmbito Samelis *et al.* (2005), citam que o uso do lactato de sódio, um sal natural com ação acidificante do meio intracelular dos micro-organismos e consequente redução da sua atividade metabólica, além de permitir o alcance de uma menor atividade de água, tem sido empregado por sua função antimicrobiana.

Identificado em estudo realizado por González-Fandos, E. e Herrera, B. (2013) que a imersão, por um período de 5 minutos, em uma concentração de 1 ou 2% de ácido propiônico, reduziu a contagem de mesófilos entre 0,81 e 1,78 unidades logarítmicas em comparação com os cortes de frango utilizados como controle durante o armazenamento.

Campêlo *et al.* (2017), avaliaram o uso de ácido láctico, lactato de sódio e uma combinação de ambos para conservação de carne de sol refrigerada, reduzindo o uso do sal como conservante. As carnes tratadas apresentaram menor contagem microbiana do que as amostras controles e a combinação dos ácidos chegou a elevar o período de vida útil em seis dias. Neste estudo, a equipe concluiu que conservantes naturais, em especial o ácido láctico, podem ser alternativas viáveis como substituição ao cloreto de sódio na conservação de alimentos.

Metri *et al.* (2006), aspergiram solução contendo ácido acético, láctico, cítrico e ascórbico na matéria prima cárnea utilizada para elaboração de hambúrguer defumado. Apesar de no dia zero a contagem de coliformes fecais se apresentar acima do limite permitido em legislação vigente, com o decorrer do tempo, após sete dias da aplicação dos ácidos e da defumação líquida, este parâmetro atendeu ao

requisito microbiológico na matéria prima e, ao final de 14 dias, todos os parâmetros microbiológicos foram atendidos para o produto final.

Freiberger *et al.* (2016), aplicaram o uso dos ácidos láurico, cítrico, láctico, acético, ascórbico e seus sais de sódio, diluídos em óleo de soja na superfície de linguiças cozidas. Os critérios utilizados pelos autores para avaliar se os produtos eram aptos ou impróprios para consumo incluíram presença de *slime*, pH e contagem de bactérias ácido lácticas. Ao final do estudo, apenas 7,6% das amostras sem aplicação do conservante apresentavam características similares ao produto padrão, frente a 41,3% das amostras com a adição do conservante. O tempo de vida de prateleira elevado de 65,21 dias para 95,58 dias demonstra o efeito bactericida e bacteriostático dos ácidos orgânicos sobre as bactérias ácido lácticas, responsáveis pela deterioração das amostras.

Gómez Cárdenas *et al.* (2013), mostraram em seu estudo que a aplicação de antimicrobianos naturais podem conferir proteção extra ao processamento de carne bovina. O resultado obtido pela equipe que analisou a aplicação de nisina, lactato de sódio, lactato de potássio e acetato lactato individualmente quando aplicados na carne moída para fabricação de hambúrguer, demonstrou eficácia no controle microbiológico de todos os tratamentos, porém com restrições na aceitação sensorial para o uso de nisina.

Silva *et al.* (2014), adicionaram na formulação da linguiça toscana lactato de sódio, nisina e uma combinação de lactato de sódio com nisina, para checar o período de validade deste alimento. Sob o ponto de vista bacteriológico a adição da combinação de lactato de sódio e nisina apresentou os melhores resultados, elevando em pelo menos cinco dias o período de vida útil do produto. O uso isolado do lactato de sódio se mostrou mais eficaz para retardar o desenvolvimento das bactérias mesófilas. A nisina quando aplicada isoladamente não manifestou aumento na validade, tendo comportamento semelhante aos das amostras controle.

### **3.6.3 Nisina**

Muitas bactérias produzem proteínas que inibem, ou até mesmo matam, espécies estreitamente relacionadas ou linhagens diferentes de uma mesma espécie. Estes agentes são chamados de bacteriocinas. As bactérias ácido lácticas produzem a bacteriocina nisina, que inibe o desenvolvimento de uma ampla variedade de

bactérias gram-positivas, sendo a única bacteriocina largamente comercializada e de uso permitido como conservante na indústria de alimentos (MADIGAN *et al.*, 2010).

A nisina consiste em uma bacteriocina geralmente reconhecida como segura, que atua reconhecendo e ligando os lipídios aniônicos da célula alvo, resultando em perturbações temporárias e na formação de um poro na membrana citoplasmática que resulta na lise celular e morte do micro-organismo (BORTOLOTTO *et al.*, 2021).

A nisina também pode atuar interagindo com os locais onde são ligados os pirofosfatos de alta afinidade, no lipídio II da membrana. Com a formação dos poros, partes vitais do citoplasma são perdidos, extravasando da célula e levando à sua morte (BORTOLOTTO *et al.*, 2021).

Apesar da interferência pela interação com muitos fatores intrínsecos do alimento como composição, gordura, fosfato ou ainda micro-organismos, condições de processamento e estocagem, a nisina tem apresentado eficácia no controle de bactérias patogênicas e deteriorantes em muitos produtos cárneos (DE BARROS; KUNIGK; JURKIEWICZ, 2010).

No estudo conduzido por Bortolotto *et al.* (2021), foi identificado que o uso de nisina combinada com  $\epsilon$ -poly-L-lysina, apresentou efeito inibitório contra o *Lactobacillus plantarum*, bactéria do gênero ácido láctico isolada durante o experimento a partir de amostra de linguiça cozida. O efeito inibitório identificado em laboratório, pelo método da concentração inibitória mínima, requer baixas concentrações destes componentes, 0,05 $\mu$ g/l e 9,375 $\mu$ g/l, respectivamente. Sabe-se que a aplicação *in vitro* requer geralmente menor concentração de antimicrobianos, no entanto, o efeito sinérgico obtido, mostra que é possível a aplicação em matriz cárnea, auxiliando as indústrias de alimentos.

Grisi e Gorlach-Lira (2005), compararam o uso de nisina e pH elevado para controlar a proliferação de micro-organismos em carne de caranguejo. No entanto, esta combinação apresentou efeito inibitório somente para culturas de *S. aureus* e *Salmonella* sp. aplicado em caldo. O mesmo comportamento não foi observado quando aplicado na carne de caranguejo, visto seu alto pH e capacidade tampão. Ao fixar pH entre 6 e 7,5, a nisina preveniu efetivamente a multiplicação de patógenos.

Nos estudos comentados fica evidente a interferência de fatores como pH, temperatura, ácidos orgânicos, entre outros na efetividade de ação da nisina como conservantes microbiológico.

#### 3.6.4 Diacetato de Sódio

O diacetato de sódio é um agente acidulante, com ação conservante e aromatizante sabor vinagre. Utilizado principalmente contra a germinação de fungos em produtos de panificação. Também pode ser aplicado em produtos cárneos, conservas e para elaboração de temperos e aromas (ASAE, NI).

A aplicação do diacetato de sódio em produtos cárneos, composto por 60% de acetato de sódio e 40% de ácido acético, contribui para a redução de bactérias aeróbicas e impede o desenvolvimento de patógenos.

#### 3.6.5 Extratos

Os extratos cítricos são utilizados com o objetivo de prevenir o surgimento e proliferação de micro-organismos deteriorantes. A aplicação na indústria de alimentos é recomendada por sua ação antifúngica e antibacteriana, conferindo efeito sinérgico ao uso de outros antioxidantes. Enquanto o extrato de alecrim, por possuir alto teor de polifenóis, controla a oxidação, prevenindo a rancidez nos produtos cárneos (JENKO *et al.*, 2018).

Boeira *et al.* (2018), utilizaram diferentes métodos de extração dos compostos bioativos do capim-limão (*Cymbopogon citratus*) para checar sua atividade antioxidante e antimicrobiana em linguças de frango. A extração dos compostos pelo método convencional, utilizando solvente, e a extração assistida por ultrassom, foram obtidas em diferentes temperaturas, tendo o método convencional a 60°C extraído a maior quantidade de compostos bioativos. Neste estudo, a equipe identificou que a adição de 1,0% do extrato foi suficiente para proteção das linguças, mantendo estável a multiplicação de mesófilos totais até o 21º dia de fabricação e protegendo contra bactérias psicrotróficas até o 42º dia de fabricação.

#### 3.6.6 Óleo de Coco

O óleo de coco detém propriedades como sabor suave, odor agradável e elevada resistência ao ranço. Sua insaturação em baixo nível, o torna estável para a oxidação. É conhecido por ter efeitos antivirais e antibacterianos e excelentes propriedades curativas.

Ramos, Andreani Júnior e Kozusny-Andreani (2016), testaram o uso de dez diferentes óleos essenciais no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutas. Dentre os tratamentos, o óleo de coco apresentou resultado intermediário, já que a atividade fungicida foi comprovada somente em concentrações de 50%.

O fruto do coqueiro tem na área alimentícia sua principal aplicação. Acreditasse que o desenvolvimento de tecnologias na área de alimentos proporcione inovação e aperfeiçoamento de técnicas, produtos e processamento que possam conhecer e explorar melhor este recurso (FREIRE ARAÚJO *et al.*, 2020).

Conforme mencionado por Freiburger *et al.* (2016), existem vários estudos relacionados ao uso de ácidos orgânicos, porém pesquisas utilizando combinações de ácidos são escassas. Grisi e Gorlach-Lira (2005), comentam a necessidade de mais pesquisas considerando a interação do tratamento testado, com outros fatores como pH e temperatura, visto a correlação que podem apresentar. Além disso, fica clara a diversidade dos tratamentos aplicados para os diferentes micro-organismos envolvidos em cada produto, idêntico ao observado por Silva *et al.* (2014).

Desse modo, o presente trabalho visa considerar as variações às quais o produto foi submetido e as interações entre os componentes de cada tratamento aplicado na linguiça tipo calabresa. Outro fator importante é a escassez de material no que se refere a produtos industrializados, condimentados. O maior volume de estudos disponível está focado na carne *in natura*, sendo a aplicação em linguiça cozida um diferencial do estudo desenvolvido.

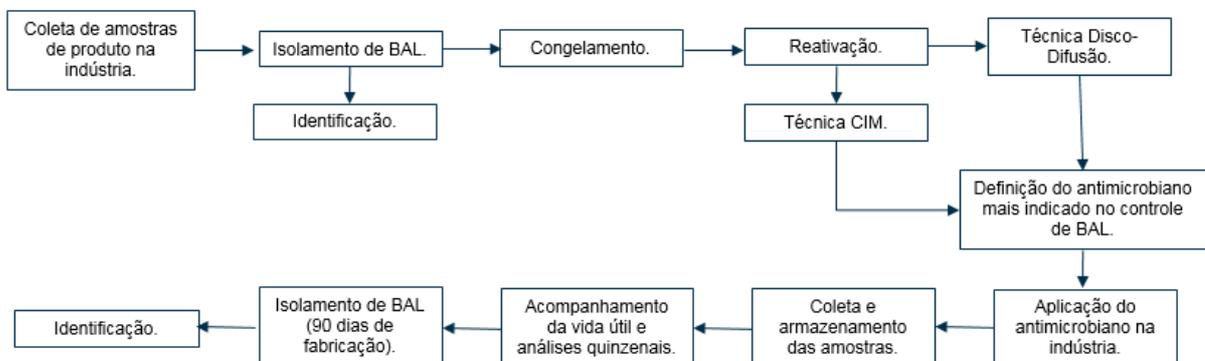
#### 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em três etapas. A etapa inicial consistiu no isolamento de bactérias ácido lácticas (BAL) a partir de linguiça tipo calabresa e identificação das espécies em laboratório. Em seguida, esses isolados foram submetidos à aplicação de quatro tratamentos *in vitro* (fumaça líquida, ácido láctico e ácido propiônico, nisina, nisina com diacetato de sódio e extratos cítrico e de alecrim e, óleo de soja, com óleo de coco), utilizando a concentração inibitória mínima e o teste de sensibilidade a antimicrobianos pela técnica de disco-difusão. A condição mais adequada foi interpretada como a solução que apresentou maior dificuldade para a proliferação dos micro-organismos testados.

Após determinação *in vitro* da melhor solução antimicrobiana para retardo da multiplicação das bactérias ácido lácticas isoladas de amostras de linguiça tipo calabresa, o estudo seguiu para sua etapa final, onde o tratamento foi replicado no produto, em uma unidade de alimentos industrializados do Oeste do estado de Santa Catarina. A aplicação se deu pela dosagem da solução diretamente sobre os gomos da linguiça tipo calabresa, dentro da embalagem e acondicionamento posterior em câmaras com temperatura controlada para acompanhamento da multiplicação das bactérias ácido lácticas e sua interferência na conservação do produto.

De modo a facilitar a visualização e entendimento do estudo, as etapas de desenvolvimento estão relacionadas na figura 2.

Figura 2 - Etapas de Desenvolvimento do Estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

#### 4.1 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE LINGUIÇA TIPO CALABRESA

Três amostras de linguiça tipo calabresa (identificadas como A, B e C), elaboradas seguindo a formulação e o programa de cozimento padrão da empresa e atendendo ao Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do produto, foram coletadas em uma indústria durante a etapa de embalagem. As amostras foram embaladas a vácuo em sacos de *nylon* e mantidas em temperatura ambiente durante um período de 15 dias.

A etapa seguinte foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e Microbiologia – LABMIM, localizado na UDESC/Oeste, Departamento de Zootecnia, em Chapecó (SC), onde junto à chama do bico de Bunsen e utilizando materiais estéreis, foram pesadas e homogeneizadas 1 grama de cada amostra em 9ml de água peptonada.

O isolamento das bactérias foi realizado por plaqueamento, pelo método direto em meio sólido. Para isto, foram preparadas diluições seriadas a partir da diluição inicial (correspondente ao  $10^{-1}$ ), até  $10^{-5}$ , em solução de água peptonada. Nas placas de Petri, contendo o meio MRS (*Man, Rogosa and Sharpe*) seletivo para bactérias ácido láticas, foi adicionado 0,1ml de cada uma das amostras diluídas e espalhadas uniformemente por toda a extensão da placa, utilizando alça de Drigalski. As placas foram transferidas para estufa em jarras de anaerobiose, com temperatura controlada de 30°C, durante 72 horas, conforme prevê a ISO 15214:1998.

Seguindo a metodologia de Silva *et al.* (2010), colônias dos micro-organismos que se desenvolveram nas placas de diluição  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram transferidas para tubos contendo TSA (Ágar Trypticase de Soja) inclinado. A inoculação foi realizada fazendo-se uma picada no centro do meio, sem atingir o fundo do tubo e, depois, por movimentos estriados na porção inclinada. Após, os tubos foram incubados durante 24 horas em temperatura de 36°C e, ao identificar multiplicação, as amostras foram armazenadas a -80°C.

As bactérias ácido láticas isoladas das amostras de linguiça tipo calabresa com 15 dias de fabricação foram identificadas por sistema MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*) no laboratório de Pesquisa em

Resistência Bacteriana – LABRESIS, situado no Hospital de Clínicas, em Porto Alegre (RS).

O laboratório utiliza o equipamento Microflex LT, da Bruker e identifica as amostras com base em uma pontuação, que pode variar de 0 a 3, e compara os espectros com um banco de dados próprio. Nos resultados apresentados neste estudo foram utilizadas as identificações “confiáveis a nível de espécie (cor verde)”, exceto para o gênero *Enterococcus*, onde seguindo as recomendações do laboratório, foram considerados resultados com *score* maior que 1.80.

Aos 90 dias de fabricação da linguiça tipo calabresa, período utilizado habitualmente como o de vida útil do produto, o isolamento e a identificação das bactérias ácido lácticas, seguindo as metodologias acima descritas, foram repetidos, de modo a comparar as espécies presentes.

Para isso, foram preparadas quatro condições de amostras para avaliação, sendo: placas originadas das amostras de linguiça tipo calabresa controle, mantidas em temperatura de até 8°C, placas originadas das amostras de linguiça tipo calabresa controle, mantidas em temperatura de 25°C +/-1, placas originadas das amostras de linguiça tipo calabresa tratada, mantidas em temperatura de até 8°C e, por fim, placas originadas das amostras de linguiça tipo calabresa tratada e mantidas em temperatura de 25°C +/-1. Após período de incubação e checagem das placas, aquelas que apresentaram multiplicação bacteriana foram enviadas novamente para identificação em sistema MALDI-TOF, permitindo a comparação entre as espécies de ácido lácticas presentes no início e ao final do tempo de vida útil do produto.

## 4.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO

### 4.2.1 Concentração Inibitória Mínima

Os isolados obtidos aos 15 dias de fabricação da linguiça tipo calabresa e conservados em freezer, foram reativados em caldo MRS, em temperatura de 35°C e padronizados por comparação com a escala 0,5 da de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). Posteriormente, foram submetidos aos tratamentos 1, 2, 3 e 4 (tabela 2) utilizando a metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM, do inglês *minumum inhibitory*

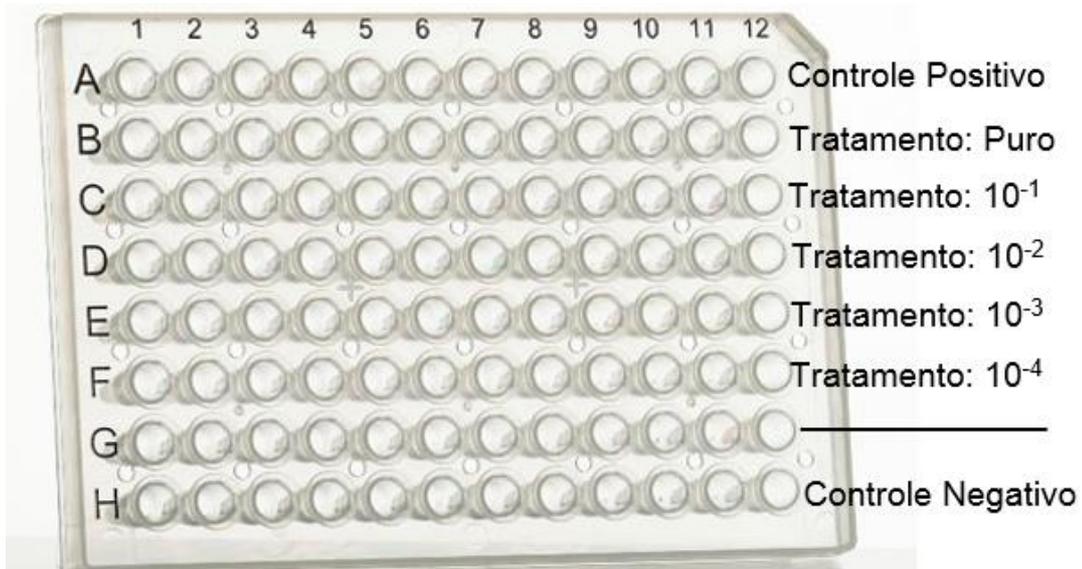
concentration), seguindo as recomendações do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017).

Este método é utilizado para determinar a menor concentração do tratamento necessária para inibir ou eliminar determinado micro-organismo (TRABULSI; LATERTHUM, 2008).

Para a determinação da CIM, em capela de fluxo laminar e próximo à chama do bico de Bunsen, concentrações de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  de cada tratamento antimicrobiano (tabela 2) foram acrescidas ao meio líquido Mueller-Hilton e ao caldo MRS, distribuído em placas de ELISA e aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml dos micro-organismos isolados foram inoculados em cada poço da placa. Nas placas, a linha B foi utilizada para inoculação dos isolados em tratamento puro. A primeira linha (A) foi utilizada como controle positivo, onde foram inoculadas as bactérias e adicionado o meio Mueller-Hilton ou o caldo MRS, sem a aplicação de nenhum tratamento e a última linha (H) foi utilizada como controle negativo, contendo somente o meio Mueller-Hilton ou o caldo MRS. A linha G não foi utilizada, de forma a evitar uma possível contaminação no controle negativo. O volume aplicado em cada poço compreende 100  $\mu$ l da solução, tratamento puro ou caldo e 20  $\mu$ l no inóculo.

A figura 3 exemplifica a distribuição dos tratamentos na placa de ELISA.

Figura 3 - Distribuição dos Tratamentos na Placa de ELISA.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

As placas foram incubadas por 24 horas (para o meio líquido Mueller-Hinton) e 48 horas (para o caldo MRS), a 35°C e foi considerada a CIM a menor concentração entre os tratamentos, que apresentou maior inibição à multiplicação das bactérias inoculadas.

Durante a multiplicação exponencial, os componentes celulares aumentam conforme a proliferação no número de células. Com isso, uma alternativa para identificação do número de células ao longo do tempo, é a identificação do aumento da quantidade de proteína, ou DNA. Este método rápido para estimativa de multiplicação celular está embasado na medida de turbidez da amostra (MADIGAN *et al.*, 2010). As células de uma suspensão, dispersam a luz que a atravessa. Sendo assim, quanto maior o número de células, maior a dispersão da luz e turbidez da suspensão, representando a multiplicação bacteriana.

#### **4.2.2 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão**

Os isolados obtidos a partir da linguiça tipo calabresa com 15 dias de fabricação, e conservados em -80°C, foram reativados em caldo MRS, em temperatura de 35°C e padronizados por comparação com a escala 0,5 da de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml). Posteriormente, foram submetidos aos tratamentos 1, 2, 3 e 4 (tabela 2) utilizando o Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão, seguindo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

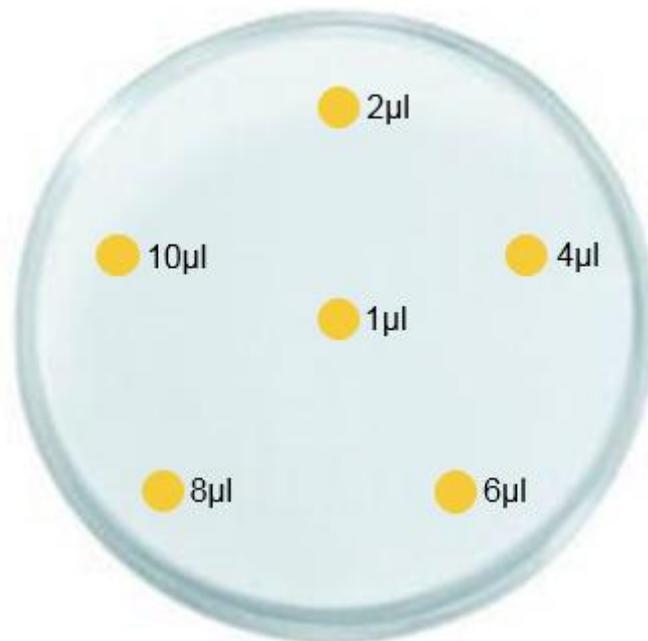
O método de disco-difusão é aplicado para avaliação da eficácia de um agente químico. Para isso, um disco de papel filtro embebido no composto a ser testado é colocado em uma placa contendo ágar que foi previamente inoculada com o micro-organismo alvo. Após incubação, a formação de uma zona clara em torno do disco, inibindo a multiplicação bacteriana, indica que o produto é eficaz (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Em capela de fluxo laminar, próximo à chama do bico de Bunsen, *swab's* estéreis foram utilizados para semear uniformemente o inóculo por toda a superfície das placas de Petri, contendo o meio MRS. O procedimento foi repetido três vezes, girando a placa aproximadamente 60°, por fim, o *swab* foi aplicado na margem da placa, assegurando a distribuição uniforme do inóculo.

Discos de papel filtro, com 6 milímetros de diâmetro, previamente autoclavados, foram dispostos espaçadamente nas placas, pressionando-os levemente para um contato completo com a superfície do meio. Os discos foram embebidos com 1, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{l}$  de cada um dos quatro tratamentos antimicrobianos testados. As placas foram elaboradas em triplicata e incubadas a 35°C, por 24 horas. As zonas de inibição foram consideradas as áreas sem multiplicação bacteriana detectável a olho nu e os diâmetros medidos com auxílio de uma régua, incluindo o diâmetro do disco.

A distribuição dos discos contendo os tratamentos nas placas de Petri está representada na figura 4.

Figura 4 - Distribuição dos Discos Contendo Tratamento Antimicrobiano nas Placas de Petri



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

### 4.3 APLICAÇÃO DO TRATAMENTO ANTIMICROBIANO NA LINGUIÇA TIPO CALABRESA EM FÁBRICA

Os experimentos foram desenvolvidos em uma unidade de industrializados localizada na região Oeste do estado de Santa Catarina, a qual opera com Serviço de Inspeção Federal (SIF) atuante e tem o programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) devidamente implantado.

A linguiça tipo calabresa em sua formulação padrão foi obtida a partir de carne suína e de frango, tratada por sais de cura e condimentos. As matérias primas foram moídas, misturadas e receberam os ingredientes. Após, foram destinadas para embutimento em envoltório natural, cozimento em programa específico e padrão para o item, defumação, resfriamento, pesagem e embalagem.

O tratamento número 1 (tabela 2), cuja fumaça líquida é composta de ácido láctico e ácido propiônico, de melhor resultado identificado pela técnica de Sensibilidade a Antimicrobiano por Disco-Difusão, foi utilizado a nível industrial. A adição do referido tratamento ocorreu na etapa de embalagem, em concentração de 50 gramas do antimicrobiano, por quilo de linguiça tipo calabresa, conforme recomendação do fabricante, diretamente sobre os gomos, dentro da embalagem de *nylon*. Para este volume, o princípio ativo corresponde a 5 gramas de ácido láctico e 0,05 gramas de ácido propiônico. Posteriormente, os pacotes foram selados e extraído o vácuo, estando finalizados para a coleta.

Com as amostras preparadas, foram coletados 70 pacotes de produto tratado, sendo que metade foi mantido em temperatura controlada de até 8°C e a outra metade em temperatura de 25°C +/-1.

Do mesmo modo, foram coletados 70 pacotes sem adição de tratamento. Metade destes armazenados em câmara de estocagem a temperatura de até 8°C e a outra metade em câmara de estocagem com temperatura de 25°C +/-1, a servir de controle.

#### 4.4 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA LINGUIÇA TIPO CALABRESA

As amostras com aplicação de tratamento antimicrobiano e as amostras controle, em ambas as condições de armazenagem, foram submetidas a ensaios microbiológicos para a quantificação de mesófilos totais e bactérias ácido lácticas, aos 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias de armazenamento. Os ensaios foram realizados em triplicata em laboratório da empresa, acreditado pelo INMETRO, utilizando metodologia de referência.

#### **4.4.1 Contagem de Bactérias Ácido Lácticas**

Para a contagem de bactérias ácido lácticas foi utilizado sistema pronto de meio de cultura que contém nutrientes, agentes seletivos, um agente geleificante solúvel em água fria e um indicador de tetrazólio que facilita a enumeração de colônias. A placa contém compostos para eliminação de oxigênio que criam um ambiente anaeróbico para a recuperação de bactérias lácticas homofermentativas (produtoras de ácido láctico) e heterofermentativas (produtoras de gás e ácido láctico).

A metodologia reconhecida utilizada foi a AFNOR Validation, Certificate Number 3M 01/19-11/17, 3MTM Petrifilm™ Lactic Acid Bacteria Count Plate.

#### **4.4.2 Contagem de Mesófilos Totais**

Para determinação de mesófilos totais das amostras foi utilizado um sistema pronto de meio de cultura que contém nutrientes do ágar padrão (PCA), um agente geleificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólio que facilita a enumeração das colônias.

A metodologia de referência utilizada foi a AOAC Official Method 990.12, Aerobic Plate Count in Foods Dry Rehydratable Film (Petrifilm™ Aerobic Count Plate) Method. 21ª ed. 2019.

### **4.5 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DA LINGUIÇA TIPO CALABRESA**

As amostras do tratamento e controle tiveram suas características físico-químicas de atividade de água e pH avaliados aos 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias de fabricação.

#### **4.5.1 Atividade de Água – $A_w$**

A quantidade de água presente em um alimento pode se encontrar na forma de água ligada e não-ligada. A relação entre o teor de água não-ligada (disponível) das amostras foi avaliada com o uso do aparelho AquaLab, em triplicata.

A amostra de linguiça tipo calabresa foi triturada em liquidificador e acondicionada na cápsula de leitura até a linha de marcação, preenchendo todo o fundo da cápsula. A borda e área externa da cápsula foram limpas para devida leitura.

Cada cápsula foi colocada no equipamento e acionada a leitura. A cada término o equipamento emite sinal sonoro e luminoso.

#### 4.5.2 Potencial Hidrogeniônico – pH

O pH de todas as amostras de linguiça tipo calabresa durante o armazenamento foi medido em triplicata, com equipamento LineLab, provido de eletrodo de vidro para leitura.

Ao ligar o equipamento ele estava automaticamente no modo de medição. A sonda com eletrodo foi inserida no produto e aguardado até estabilização e indicação do sinal sonoro, quando foi realizada a leitura.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados da contagem bacteriana (ácido lácticas e mesófilos totais), pH e atividade de água foram obtidos em triplicata e testados para homogeneidade de variância e normalidade de resíduos (pressuposições a análise de variância). Foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 8$  (2 grupos, 2 condições de temperatura e 8 períodos de armazenamento). Foi testado o efeito da interação tripla entre grupos, temperaturas e dias. Quando a interação tripla é não significativa ( $p > 0,05$ ), observa-se as interações duplas. Somente serão avaliados os fatores isoladamente se nenhuma interação for significativa. Quando detectada diferença significativa, foram utilizados os testes de Fisher-Snedecor e Tukey (5%). Os procedimentos foram calculados utilizando-se o SAS 9.4.

#### 4.7 MODELAGEM MATEMÁTICA

De acordo com Tortora, Funke e Case (2012) a curva que representa o modelo de multiplicação bacteriana é a da figura 01. No presente estudo foi corroborado este comportamento através das análises de contagem das bactérias ácido lácticas (UFC/g) e o ajuste pelo modelo matemático  $N = N_0 2^n$ , equações (1) à (4). Utilizado o *software Microsoft Excel* para mostrar o comportamento semelhante entre as curvas de multiplicação bacteriana descritas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICAS (BAL) NAS AMOSTRAS DE LINGUIÇA TIPO CALABRESA

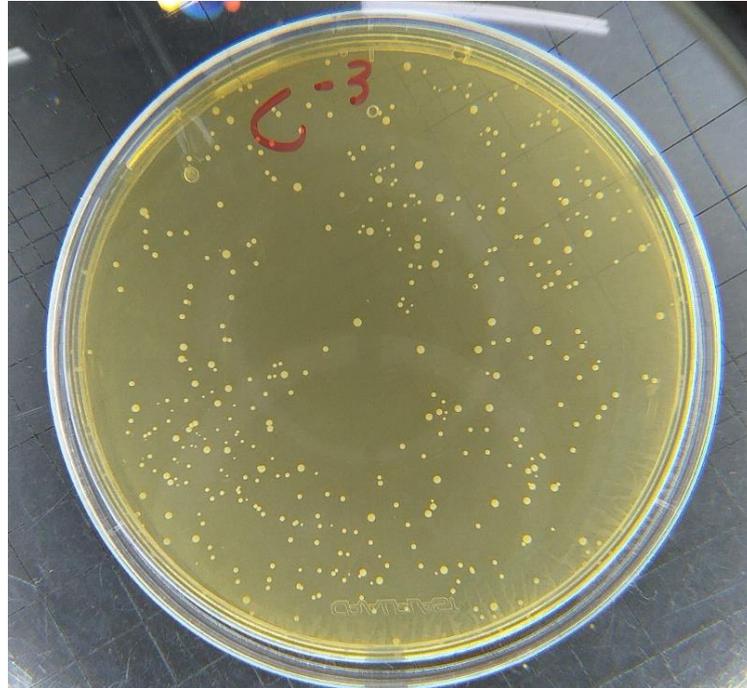
A identificação das bactérias ácido lácticas presentes na linguiça tipo calabresa aos 15 dias de fabricação, sem a aplicação de qualquer tratamento antimicrobiano na superfície dos gomos ou temperatura de refrigeração, identificou as espécies *Leuconostoc citreum* e *Lactobacillus sakei*, comumente relacionadas a produtos cárneos cozidos, embalados a vácuo (KALSCHNE *et al.*, 2014; FREIBERGUER *et al.*, 2016).

Para as placas elaboradas a partir da linguiça tipo calabresa com 90 dias de fabricação, somente aquelas preparadas a partir das amostras de produto controle e mantidas em temperatura de 25°C +/-1, apresentaram multiplicação de bactérias ácido lácticas. E nelas, foram identificadas as espécies *Staphylococcus hominis* e *Enterococcus devriesei*, sendo uma constatação pouco comum em alimentos.

As colônias cultivadas em placas contendo meio MRS, a partir de amostras de linguiça tipo calabresa elaboradas em nível industrial, com 15 dias de fabricação, estão exibidas na figura 5, enquanto as colônias identificadas nas amostras controle, mantidas a temperatura de 25°C +/-1 e com 90 dias de fabricação, estão apresentadas na figura 6.

Para os dois períodos de multiplicação, aos 15 e aos 90 dias, as colônias formadas nas placas apresentaram coloração branca, formato circular e diâmetro pequeno (0,5 a 2,0mm), características idênticas as observadas anteriormente em estudo desenvolvido por Kalschne *et al.* (2014), ao isolarem bactérias do gênero ácido láctico a partir de presunto cozido embalado a vácuo.

Figura 5 - Características das Colônias de BAL Obtidas das Amostras de Linguiça Tipo Calabresa aos 15 Dias de Fabricação.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Figura 6 - Características das Colônias de BAL Obtidas das Amostras Controle de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de 25°C +/-1, aos 90 Dias de Fabricação.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Já as placas elaboradas a partir da linguiça tipo calabresa com 90 dias de fabricação e que receberam o tratamento 1 (fumaça líquida composta dos ácidos láctico e propiônico), em ambas as condições de temperatura de armazenagem, bem como as placas elaboradas a partir da linguiça tipo calabresa controle, com 90 dias de fabricação e mantida em temperatura de até 8°C, não apresentaram multiplicação de bactérias ácido lácticas, conforme observado na figura 7.

Figura 7 - Características das Colônias de BAL Obtidas das Amostras Tratadas e Controle de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de até 8°C e Amostras Tratadas, Mantidas em Temperatura de 25°C +/- 1, aos 90 Dias de Fabricação (Não Houve Desenvolvimento).



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Para a identificação em sistema MALDI-TOF, as amostras com 15 dias de fabricação foram identificadas como “A”, “B” e “C”, enquanto as amostras controle aos 90 dias de fabricação, que apresentaram multiplicação, foram identificadas como “C a 25°C” (com expoente referenciando a diluição da amostra, conforme apresentado na tabela 3). As espécies de bactérias ácido lácticas resultantes das análises estão relacionados na tabela 3:

Tabela 3 - Comparativo da Identificação em Sistema MALDI-TOF das Espécies de Bactérias Ácido Lácticas Presentes na Linguiça Tipo Calabresa no Início (15 Dias de Fabricação) e ao Final (90 Dias de Fabricação) do seu Período de Vida Útil.

<b>Amostra</b>	<b>Dias de Fabricação</b>	<b>Identificação</b>
----------------	---------------------------	----------------------

A-1	15	<i>Leuconostoc citreum</i>
A-2	15	<i>Leuconostoc citreum</i>
A-3	15	<i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactobacillus sakei</i>
C25-1	90	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Enterococcus devriesei</i>
C25-2	90	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Enterococcus devriesei</i>
C25-3	90	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Enterococcus devriesei</i>
C25-4	90	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Enterococcus devriesei</i>

A: Amostra mantida em temperatura ambiente. C25: Amostra controle mantida em temperatura de 25°C +/-1.

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

A identificação das bactérias ácido lácticas a partir das linguiças tipo calabresa aos 15 dias de fabricação, apresentados na tabela 3, demonstra a similaridade dos resultados obtidos por Freiberguer *et al.* (2016), que relacionam em seu estudo a deterioração de produtos cárneos cozidos embalados a vácuo com os gêneros *Lactobacillus* spp., *L. sakei* e *L. curvatus*, seguido por *Leuconostoc* spp., *Weissella* spp. e *Carnobacterium* spp.

*Leuconostoc* são cocos mesófilos Gram-positivos, catalase negativa e obrigatoriamente heterofermentadores. Toleram concentrações elevadas de sal e açúcar e são produtores de gás (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Esta capacidade de tolerar elevado teor de soluto elucidada o seu desenvolvimento em produtos industrializados condimentados, como é o caso da linguiça tipo calabresa.

São micro-organismos imóveis, aerotolerantes e, por serem muito exigentes nutricionalmente, precisam de fonte de aminoácidos, vitaminas e minerais para crescer. Apresentam o CO<sub>2</sub> como produto primário da fermentação (HOLLAND; LIU, 2011), o que é evidenciado pela frequente produção de gás identificado em produtos industrializados, relacionado às bactérias do gênero ácido láctico.

O *Leuconostoc citreum*, identificado no estudo, pode comprometer a qualidade de produtos cárneos e da linguiça tipo calabresa pela formação de *slime* (“*ropy spoilage*”). Confirmando a afirmação de Ivami (2018), que cita que o gênero

*Leuconostoc* está amplamente distribuído na natureza e, apesar de ser utilizado intencionalmente na indústria alimentícia por conferir sabor, aroma e textura em produtos lácteos e pela proteção proporcionada pela produção de bacteriocinas, algumas espécies também são responsáveis pela deterioração de alimentos. O gênero é composto por 24 espécies diferentes e tem o *Leuconostoc citreum* como um dos mais importantes.

Kalschne *et al.* (2014), identificaram em amostras de presunto cozido embalado a vácuo a presença de *Lactobacillus* sp. e *Leuconostoc* desde o primeiro dia de armazenamento. Aos 45 dias de fabricação a microbiota predominante era formada por *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc mesenteroides*. O resultado obtido por estes pesquisadores sobrepõem ao do presente estudo, comprovando o envolvimento dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* na deterioração de industrializados cárneos cozidos, embalados a vácuo.

*Lactobacillus* são bacilos Gram-positivos, catalase negativa e microaerófilos. Franco e Landgraf (2008), indicam ainda em seu estudo que os *Lactobacillus* são capazes de suportar temperatura tanto de refrigeração, quanto de pasteurização e outros processos térmicos, contribuindo para a deterioração de alimentos submetidos a esses tipos de tratamentos. Da mesma forma que para os autores, o gênero foi identificado neste estudo, após submissão das linguças a tratamento térmico, já nos primeiros dias de armazenagem.

Na etapa de embalagem das linguças tipo calabresa, a extração de vácuo e a eliminação do oxigênio dos pacotes, não ocorre em sua totalidade. Isso justifica a identificação dos *Lactobacillus* nas amostras deste estudo, já que conforme citado por Tortora, Funke e Case (2012), a maioria das bactérias deste gênero não possui um sistema de citocromo e não utiliza o oxigênio como aceptor de elétrons, diferente do que ocorre com a maioria dos anaeróbios obrigatórios, essas bactérias são aerotolerantes e capazes de se multiplicar na presença de oxigênio.

Os *Lactobacillus* podem ainda representar um importante aliado na prevenção e combate ao desenvolvimento de bactérias patogênicas nas linguças tipo calabresa. Isto ocorre pois, conforme citado por Tortora, Funke e Case (2012), mesmo apresentando um metabolismo reduzido, a produção de ácido lático a partir de carboidratos simples faz com que esse grupo cresça de modo competitivo, inibindo o desenvolvimento de organismos concorrentes. Bactérias patogênicas frequentemente

relacionadas a alimentos, são pouco resistentes a condições de acidez, como é o caso da *Salmonella*, com pH ótimo de multiplicação entre 6,5 e 7,5, da *Listeria monocytogenes*, que apresenta pH ótimo entre 6 e 8 e do *Staphylococcus aureus*, com pH ótimo na faixa de 6 a 7.

Do mesmo modo que neste estudo, Kalschne *et al.* (2014), também identificaram a presença de *Lactobacillus* aos 45 dias de fabricação do presunto cozido. Isso ocorre, pois, seguindo o observado por Madigan *et al.* (2010), os *Lactobacillus* são geralmente mais resistentes a condições ácidas do que outras bactérias do grupo ácido láctico, capazes de crescer em pH 4, por exemplo. Essa resistência a ambientes ácidos permite que os *Lactobacillus* continuem a crescer mesmo nos casos em que o pH se tornou demasiadamente baixo para o desenvolvimento de outras bactérias do grupo. Por conta disso, são os responsáveis pelos estágios finais da maioria dos processos de fermentação do ácido láctico.

Os micro-organismos relacionados na tabela 3, *Staphylococcus hominis* e *Enterococcus devriesei*, identificados nas amostras controle mantidas a 25°C +/-1, aos 90 dias de fabricação, representam bactérias ubíquas, facilmente encontrados na pele de humanos e intestino de bovinos e outros animais de sangue quente, respectivamente (VÉLEZ-PAÉZ *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2014). Entretanto, estes micro-organismos estão comumente relacionados com infecções hospitalares, sendo que o *Staphylococcus hominis* é incomum em alimentos, enquanto o *Enterococcus devriesei* já foi identificado em produtos derivados do leite, como o queijo e em produtos fermentados, porém, com baixa relevância.

De acordo com Zhou *et al.* (2022), os *Staphylococcus* spp. são patógenos comuns, amplamente identificados na superfície de alimentos e na pele de animais e humanos. Dentre eles, o *Staphylococcus aureus* é um importante patógeno alimentar pela sua produção de toxina, capaz de provocar vômito, diarreia e outros danos à saúde humana. Porém, a espécie identificada neste estudo compreende o *Staphylococcus hominis*, para o qual há poucos relatos na literatura da sua interferência em alimentos, além de não ser patogênico.

A identificação do *Staphylococcus hominis* nas amostras de linguiça tipo calabresa pode ser resultante de uma contaminação cruzada, decorrente de manipulação indevida durante a etapa de embalagem, já que este micro-organismo é identificado em humanos. Seguindo Wang *et al.* (2017) e Zhou *et al.* (2022), o

*Staphylococcus hominis*, assim como outras espécies pertencentes a este gênero, é um micro-organismo oportunista e está relacionado a infecções nosocomiais da circulação sanguínea, na ocorrência de uso de dispositivos médicos implantados e a infecções agudas do trato urinário, bacteremia e endocardite em pacientes imunocomprometidos, sendo imprevista a sua identificação neste estudo.

Apesar de não ser comum, a presença do *Staphylococcus hominis* nas linguiças tipo calabresa, pode ter proporcionado proteção do alimento contra cepas do *Staphylococcus aureus*, micro-organismo patogênico pela produção de toxinas e frequentemente identificado em alimentos. Isso porque, conforme citado por Pauer *et al.* (2019), o *Staphylococcus hominis* produz a hominicina, uma bacteriocina com potente atividade antimicrobiana, eficaz contra cepas de *Staphylococcus aureus*, podendo ser um agente promissor quando devidamente aplicado. O *S. hominis* não é um micro-organismo identificado comumente em alimentos e a hominicina é uma bacteriocina recentemente descoberta e pouco conhecida, representando então um possível campo para futuros estudos e aplicação.

Os *Enterococcus* são bactérias pertencente ao grupo do ácido láctico, com formato de cocos, gram-positivas, aerotolerantes e catalase negativos. Apresentam capacidade de multiplicação em condições moderadamente restritivas, como temperatura entre 10 e 45°C, altas concentrações de sal, pH elevado, além de reter sua viabilidade após passarem por temperatura de 60°C, durante 30 minutos.

A linguiça tipo calabresa representa um produto abundante em solutos, adicionados durante sua elaboração. Aliado a este fator, a presença do *Enterococcus devriesei* nas amostras, após processo de cozimento, reitera sua sobrevivência a ambientes pouco favoráveis. Esta identificação nas linguiças vem ao encontro do que foi relatado por Martín-Platero *et al.* (2009), que citam que devido esta capacidade de sobrevivência a temperaturas elevadas e outras condições ambientais adversas, os *Enterococcus* podem estar presente em muitos alimentos de origem animal, como embutidos cárneos, lácteos, além de vegetais fermentados, como conservas e azeitonas

Conforme Rubio *et al.* (2013), o interesse pelo gênero *Enterococcus* tem aumentado nos últimos anos devido seus pontos positivos e negativos na saúde humana, higiene e tecnologia de alimentos. Esses micro-organismos possuem potencial probiótico, além de contribuir para a maturação e desenvolvimento de

aromas em queijos e embutidos cárneos. No entanto, a presença do *Enterococcus devriesei* nas amostras de linguiça tipo calabresa é um resultado que requer atenção, já que apesar das características positivas apresentadas e de não ser um agente patogênico, o *Enterococcus* é oportunista e vêm desenvolvendo resistência a antimicrobianos.

Ainda nesta ideia e comprovando a afirmação anterior, Martín-Platero *et al.* (2009) e Rubio *et al.* (2013), citam que os *Enterococcus* têm sido estudado com o objetivo de estender a vida útil de alimentos devido sua capacidade de produção de substâncias antimicrobianas, como ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, como a enterocina. Apesar disso, o uso em alimentos ainda é bastante controverso pois também podem estar associados e infecções nosocomiais, envolvidos na deterioração de alimentos e ainda na resistência a antibióticos.

Martín-Platero *et al.* (2009), comentam ainda que nos últimos anos os *Enterococcus* estão sendo relacionados por sua patogenia identificada em ambientes hospitalares, visto a crescente resistência de suas cepas à vancomicina.

O *Enterococcus devriesei* pode ter contribuído com a proteção das amostras de linguiça tipo calabresa, frente a micro-organismos patogênicos como a *Listeria monocytogenes*. Em um estudo, Rubio *et al.* (2013), utilizaram cepas de *Enterococcus devriesei* isoladas a partir de massadas em uma fábrica de produtos cárneos, como bioprotetor em salsichas de baixa acidez, inoculadas com *L. monocytogenes*. O *Enterococcus devriesei* apresentou capacidade de inibição frente ao micro-organismo patogênico inoculado já no início da maturação. Esta proteção, porém, não foi identificada frente ao *Staphylococcus aureus*.

Aliado a isso, os *Enterococcus* têm baixa capacidade de acidificação de carnes, desse modo, sua presença em embutidos cárneos fermentados, com pH relativamente alto, torna a condição adequada para sua sobrevivência e multiplicação, o que justifica o desenvolvimento deste micro-organismo somente nas amostras controle deste estudo, com pH médio de 5,67, consideravelmente maior do que o das amostras tratadas, que resultaram em um pH médio de 3,87.

Desse modo, constata-se que a proteção oferecida pelo *Enterococcus devriesei* é seletiva e restrita, já que sua capacidade de acidificação do meio é baixa, o que o torna menos competitivo. No entanto, em estudo realizado por Martín-Platero *et al.* (2009), após caracterização de 95 *Enterococcus* isolados de três tipos diferentes

de queijo de cabra, foi identificado que apenas uma pequena proporção (12,6%) foi capaz de produzir enterocinas, sendo identificado que o *E. devriesei* representava a principal espécie bacteriocinogênica, cabendo ainda maiores estudos a respeito de sua aplicação controlada.

Após discussão acerca de cada bactéria identificada, percebe-se que a primeira avaliação, realizada no início do período de vida útil da linguiça tipo calabresa, resultou em micro-organismos esperados e já identificados por outros autores. No entanto, as espécies identificadas ao final do período de vida útil do alimento, trouxeram resultados perturbadores, principalmente no que se refere ao *Staphylococcus hominis* e sua baixa relação com alimentos.

Outra constatação cabível às quatro espécies identificadas nas amostras de linguiça tipo calabresa é que cada uma delas apresenta mecanismos que podem conferir proteção, quando sua aplicação for devidamente conhecida, ao mesmo tempo em que apresentam características que podem ocasionar a perda da qualidade, tanto pela sua deterioração, quanto pelo comprometimento da segurança deste alimento.

## 5.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS POR DISCO-DIFUSÃO FRENTE AOS TRATAMENTOS TESTADOS

Para a checagem da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizadas duas repetições da aplicação dos tratamentos antimicrobiano (tabela 2) nas placas, uma utilizando o meio líquido Mueller-Hilton e na outra o caldo MRS. A cada poço foi adicionado 20 µl de tetrazólio, utilizado como revelador, de modo a facilitar a identificação de multiplicação bacteriana por meio do desenvolvimento da coloração rósea a avermelhada.

Em nenhuma das placas da CIM ocorreu multiplicação comprovada por meio do revelador em 100% dos poços da linha A, divergindo da expectativa, já que esta correspondia ao controle positivo. Diferente da turvação, que foi observada em todos os poços desta linha para os tratamentos 2 e 4. A linha H não apresentou multiplicação em nenhuma das repetições, o que era esperado por se tratar do controle negativo, indicando que não ocorreu nenhum tipo de contaminação durante a elaboração das placas e aplicação dos tratamentos.

Devido a dubiedade dos dados revelados pelas placas, optou-se pela aplicação de uma segunda metodologia, representada pelo Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão, buscando maior segurança para a definição do tratamento antimicrobiano mais indicado para uso e aplicação na linguiça tipo calabresa em fábrica.

No teste de sensibilidade por disco-difusão, realizado em triplicata, foram aplicados em cada placa 6 discos de cada tratamento antimicrobiano (tabela 2), de modo a identificar a capacidade de cada solução em inibir a multiplicação do micro-organismo inoculado.

Os resultados obtidos em cada metodologia utilizada estão apresentados na tabela 4:

Tabela 4 - Comparativo do Resultado das Metodologias CIM (em Duplicata) e Disco-Difusão (em Triplicata), Frente aos Quatro Diferentes Tratamentos Testados.

		Tratamentos e Repetições											
Método		1		2			3		4				
CIM		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>									
Disco Difusão – Zonas de Inibição (mm)	10 µl	16	18	18	8	8	7	-	-	-	-	-	-
	8 µl	14	11	19	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	6 µl	12	12	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4 µl	10	12	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 µl	8	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1 µl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

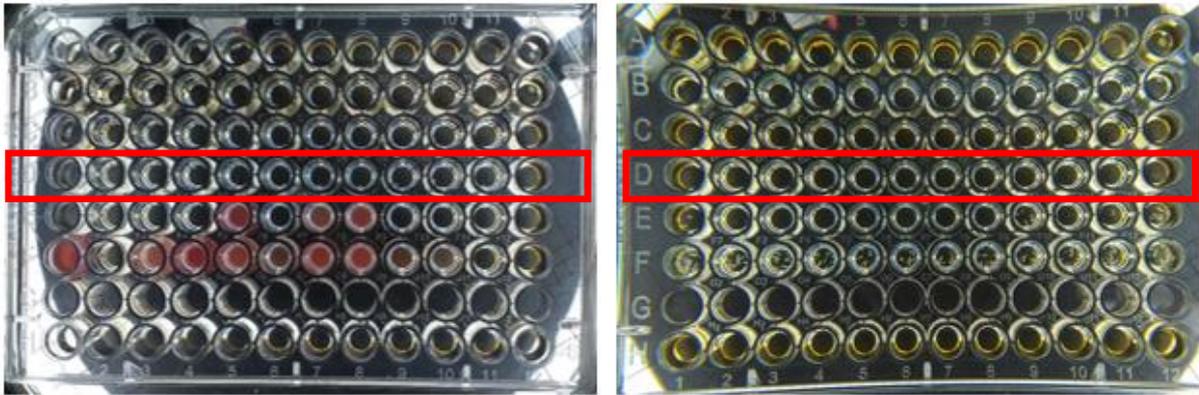
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Conforme dados apresentados na tabela 4, o tratamento que desencadeou maior dificuldade para a proliferação das bactérias ácido lácticas tanto na metodologia da CIM, quanto na dimensão das zonas de inibição formadas pelo método de disco-difusão, foi o tratamento 1 (combinação de fumaça líquida, aroma natural de fumaça, ácido láctico e ácido propiônico).

Neste tratamento, a primeira linha em que não ocorreu multiplicação em nenhum dos 12 poços na placa de ELISA foi a linha D, que corresponde a diluição 10<sup>-2</sup> da solução aplicada, visualizados pelo uso do revelador na placa elaborada com o meio líquido Mueller-Hilton. Ao utilizar o caldo MRS, a linha D também correspondeu

à primeira linha a não apresentar nenhum poço com turvação do seu conteúdo, porém não houve comprovação de multiplicação bacteriana pelo uso do indicador.

Figura 8 - CIM Tratamento 1 (Meio Mueller-Hilton X Caldo MRS).



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Para o método de disco-difusão as zonas de inibição foram observadas em 4 dos 6 discos testados em todas as repetições, demonstrando a capacidade de contenção da proliferação das bactérias ácido lácticas nos discos contendo 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{l}$  do tratamento. Nas repetições 1 e 2, também foi possível identificar pequena inibição no disco contendo 2  $\mu\text{l}$  do tratamento. Somente o disco contendo 1  $\mu\text{l}$  da solução não foi capaz de inibir o desenvolvimento microbiano em nenhuma das avaliações.

O volume de princípio ativo nos discos contendo 1, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{l}$  do tratamento, corresponde a 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0  $\mu\text{g}$  de ácido láctico e 0,0005, 0,001, 0,002, 0,003, 0,004 e 0,005  $\mu\text{g}$  de ácido propiônico, respectivamente.

As maiores zonas de inibição foram observadas nos discos de 8 e 10  $\mu\text{l}$ , com dimensões entre 14 e 19 mm.

Figura 9 - Disco-Difusão Tratamento 1.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Ao aplicar ácidos orgânicos em carne de ovinos, Metri *et al.* (2006), também observou bons resultados no critério microbiológico, assim como os evidenciados neste estudo. O uso por aspersão de 2% de ácido acético, 1% de ácido lático, 0,25% de ácido cítrico e 0,1% de ácido ascórbico foi capaz de reduzir a contagem no número de coliformes totais, até atendimento dos padrões previstos em legislação. A matéria prima tratada foi utilizada para elaboração de hambúrguer, ao qual foi adicionado o uso de fumaça líquida. Todos os micro-organismos analisados no experimento, coliformes fecais, clostridium sulfito redutor, salmonela e mesófilos, apresentaram níveis satisfatórios.

Resultado compatível foi observado pelo uso dos ácidos láurico, cítrico, lático, acético, ascórbico e seus sais de sódio em trabalho conduzido por Freiberguer *et al.* (2016). A pulverização da combinação de ácidos orgânicos sobre os gomos de linguiça cozida acarretou no desvio de 11,11% dos pacotes tratados, frente a 48,15% dos pacotes sem tratamento.

No tratamento de número 2, a primeira linha em que não ocorreu multiplicação em nenhum dos 12 poços das placas de ELISA foi na linha C, que corresponde a diluição  $10^{-1}$  da solução aplicada, visualizados pelo uso do revelador na placa elaborada com o meio líquido Mueller-Hilton. Ao utilizar o caldo MRS, a linha C também correspondeu à primeira linha a não apresentar nenhum poço com turvação do seu conteúdo, porém não houve comprovação de multiplicação bacteriana pelo uso do indicador.

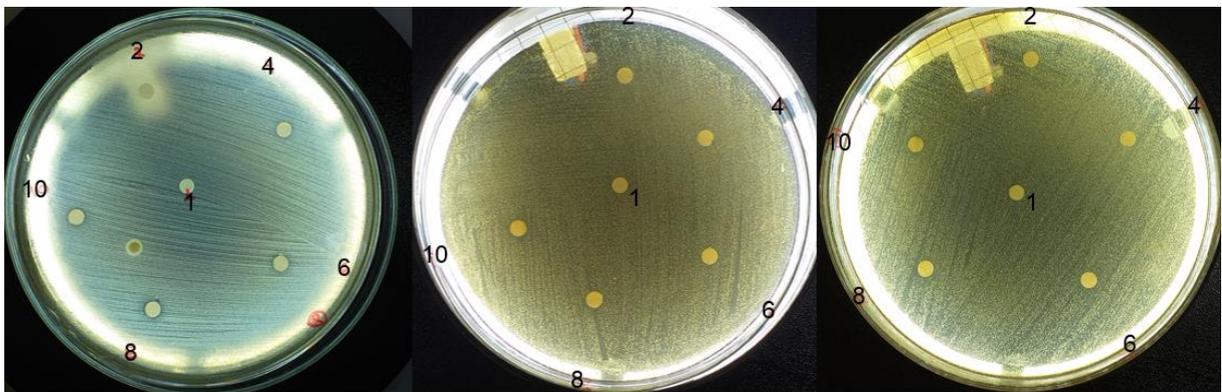
Figura 10 - CIM Tratamento 2 (Meio Mueller-Hilton X Caldo MRS).



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Corroborando ao resultado obtido pela CIM, a metodologia de disco-difusão mostrou menor eficácia para o tratamento de número 2, quando comparado ao primeiro tratamento. As zonas de inibição formadas apresentaram diâmetro máximo de 8 mm nos discos contendo 8 e 10  $\mu$ l do tratamento. Os demais discos não apresentaram efetividade no combate à multiplicação das bactérias ácido lácticas.

Figura 11 - Disco-Difusão Tratamento 2.



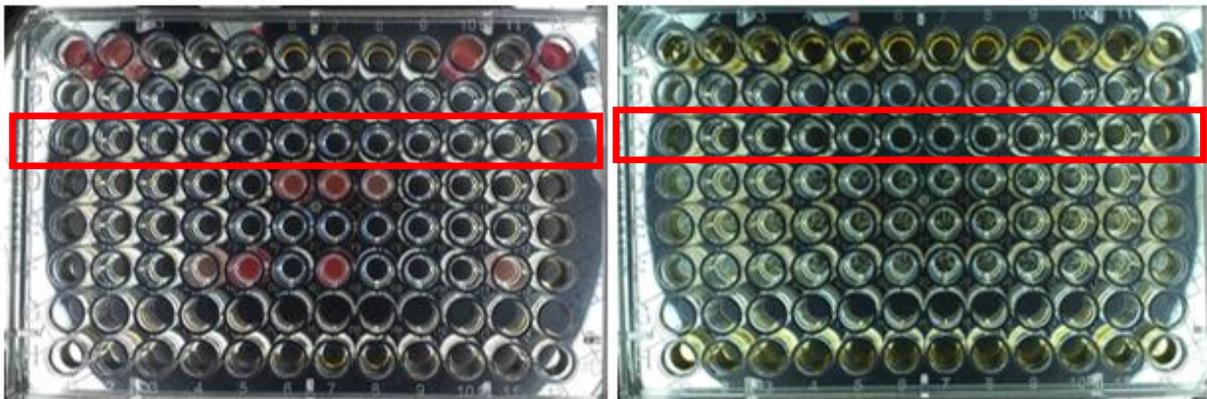
Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

O tratamento de número 2 compreendia a aplicação de nisina e não desempenhou bons resultados no combate a proliferação de bactérias ácido lácticas. Este comportamento vem ao encontro do descrito por Silva *et al.* (2014), onde a aplicação isolada de nisina não foi eficaz no controle da contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas e nem no controle de bactérias ácido lácticas e enterobactérias, quando aplicado em linguiça Toscana.

Entretanto, Bortolotto *et al.* (2020), trazem a combinação da nisina com  $\epsilon$ -poly-L-lysine como uso potencial para o controle de lactobacilos associados à deterioração de linguiça cozida, visto resultados obtidos pela técnica da CIM conduzidos em laboratório. Este trabalho direciona ao pensamento de maior probabilidade de eficácia da nisina quando combinada a outros fatores, o que requer maiores estudos.

O tratamento de número 3 compunha uma combinação de nisina, diacetato de sódio, extrato cítrico e extrato de alecrim e, a exemplo do tratamento de número 2, não atendeu a expectativa no atendimento ao controle da contagem de bactérias ácido lácticas, sendo a diluição  $10^{-1}$  a primeira linha em que não ocorreu multiplicação em nenhum dos 12 poços das placas de ELISA.

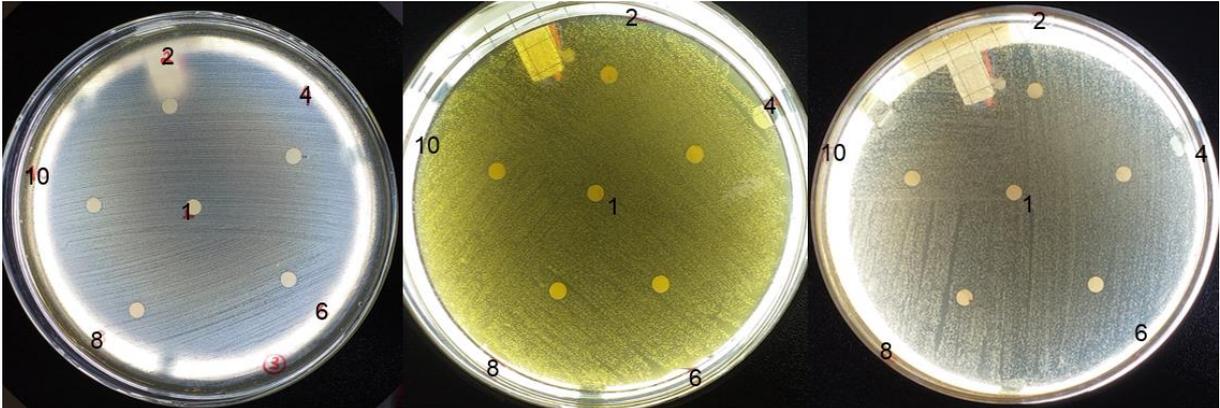
Figura 12 - CIM Tratamento 3 (Meio Mueller-Hilton X Caldo MRS).



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Contribuindo ao identificado pela CIM, o método de disco-difusão não se mostrou eficaz para o tratamento 3, identificado pela multiplicação bacteriana em toda a extensão da placa, sem sofrer interferência dos discos embebidos em solução.

Figura 13 - Disco-Difusão Tratamento 3.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Estudos utilizando diacetato de sódio no controle microbiológico de alimentos são escassos, dificultando a comparação do resultado. Por este estudo, não foi possível confirmar sua efetividade frente a proliferação de bactérias ácido lácticas, descartando o interesse de aplicação do diacetato de sódio como antimicrobiano em produtos cárneos cozidos, embalados a vácuo.

Na análise feita por Boeira *et al.* (2018), o uso do capim-limão se mostrou eficaz no controle da multiplicação de aeróbios mesófilos e bactérias psicrófilas. Esta capacidade antimicrobiana não pode ser estendida para bactérias do gênero ácido láctico, visto resultados *in vitro* obtidos neste estudo.

A exemplo do tratamento 3, o tratamento de número 4 que continha o óleo de coco, também se mostrou menos eficiente na metodologia CIM tendo a diluição  $10^{-1}$  como a primeira linha em que não ocorreu multiplicação em nenhum dos 12 poços.

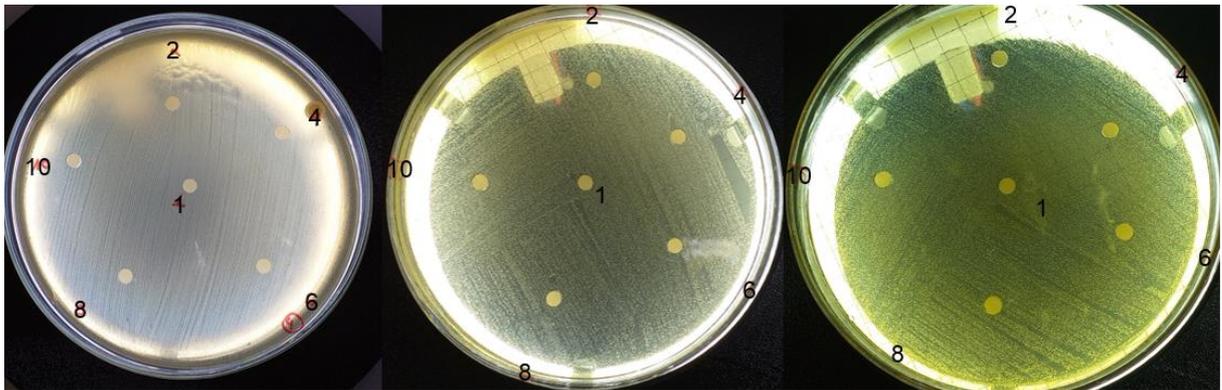
Figura 14 - CIM Tratamento 4 (Meio Mueller-Hilton X Caldo MRS).



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Aliado a isso, a dispersão das colônias de bactérias ácido láticas por toda a área da placa de Petri, contribui para a confirmação da ineficácia do tratamento fundamentado no óleo de coco.

Figura 15 - Disco-Difusão Tratamento 4.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

O óleo de coco tem amplo uso na elaboração de cosméticos e na composição de alimentos saudáveis, apesar da opinião ainda controversa dos especialistas visto seu elevado grau de saturação. Estudos sobre este ingrediente com apelo antimicrobiano ainda são escassos. No entanto, Olatunde, Benjakul e Vongkamjan (2019), avaliaram a aplicação desta propriedade a partir do extrato etanólico extraído da casca do coco.

Olatunde, Benjakul e Vongkamjan (2019), obtiveram um aumento de 3 para 9 dias na vida útil da carne de robalo com a aplicação do extrato originado da casca do coco. Este feito foi alcançado pela redução da oxidação de lipídios, retardando a deterioração, além de proteger as fatias da carne de peixe de bactérias patogênicas. Porém, este resultado satisfatório não foi identificado para as bactérias ácido láticas do presente estudo.

De Sousa, Serra e De Melo (2012), estudaram o efeito de óleos essenciais de eucalipto, copaíba, andiroba, babaçu, coco, neem, semente de uva, amêndoa, hortelã e pau rosa como alternativa para o controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, *in vitro* e em frutos de pimenta após colheita. O óleo de coco, quando aplicado *in vitro*, apresentou melhor resultado durante o uso de altas concentrações. Ainda, mostrou inibição no desenvolvimento da lesão provocada pelo fungo na planta. A maior eficácia foi apresentada durante o uso do óleo obtido a partir da semente de uva e do óleo de

amêndoa. No caso do presente estudo, o tratamento não se mostrou eficaz nem mesmo para os discos contendo 10 $\mu$ l de solução, que correspondia a maior concentração avaliada.

Fundamentado nos dados obtidos e estudos prévios, direciona-se o tratamento número 1, composto por fumaça líquida, aroma natural de fumaça, ácido láctico e ácido propiônico como a solução de maior interesse para continuidade do estudo. Um dos fatores que pode ter contribuído para que este tratamento apresentasse os melhores resultados é o fato de sua composição estar embasada em componentes ácidos, o que proporciona redução do pH do meio, tornando um ambiente pouco adequado para a maior parte dos micro-organismos patogênicos e ainda competitivo para as bactérias do grupo ácido láctico.

Desse modo, o tratamento de número 1 foi o elencado para aplicação na linguiça tipo calabresa e avaliação do comportamento microbiológico deste produto durante seu período de validade e até 105 dias, quando aplicado em nível industrial.

### 5.3 COMPORTAMENTO MICROBIOLÓGICO

Durante a etapa de embalagem da linguiça tipo calabresa em fábrica foram adicionadas 50 gramas do tratamento 1 (tabela 2), elencado como o mais indicado, a cada quilograma de produto, na superfície dos gomos.

Os pacotes que receberam o tratamento e os pacotes das amostras controle, foram selados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente controlada de até 8°C e 25°C +/-1, sendo destinados para avaliação laboratorial nos períodos de 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias de fabricação, conforme pré-determinado.

As análises quinzenais para quantificação de bactérias ácido lácticas e mesófilos totais, nas amostras submetidas ao tratamento e amostras controle, em ambas as condições de temperatura ambiente, estão apresentadas na tabela 5. A variabilidade praticamente nula obtida nos resultados, 10 UFC/g em ambos os ensaios, tanto nas amostras tratadas, quanto nas amostras controle mantidas em temperatura de refrigeração, torna dispensável a análise de variância. Os resultados similares evidenciam a diferença no comportamento das bactérias ácido lácticas e mesófilos totais apenas para as amostras controle, mantidas em temperatura de 25°C +/-1.

Tabela 5 - Comparativo Quinzenal da Média da Contagem de Bactérias Ácido Láticas (BAL) e Mesófilos Totais Entre as Amostras Tratadas e Amostras Controle, nas Diferentes Condições de Temperatura de Armazenagem (até 8°C e 25°C +/-1).

Dias de Fabricação	Tratamento				Controle			
	BAL (UFC/g)		Mesófilos (UFC/g)		BAL (UFC/g)		Mesófilos (UFC/g)	
	8°C	25°C	8°C	25°C	8°C	25°C	8°C	25°C
1	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	2,0x10
15	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	1,77x10 <sup>5</sup>	<1,0x10	2,83x10 <sup>5</sup>
30	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	1,0x10	1,67x10 <sup>7</sup>	1,4x10 <sup>5</sup>	4,1x10 <sup>5</sup>
45	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,33x10	<1,0x10	9,09x10 <sup>7</sup>	1,0x10	6,27x10 <sup>7</sup>
60	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	1,0x10 <sup>8</sup>	<1,0x10	6,7x10 <sup>7</sup>
75	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	8,67x10 <sup>7</sup>	<1,0x10	2,7x10 <sup>8</sup>
90	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	5,67x10 <sup>7</sup>	<1,0x10	1,84x10 <sup>7</sup>
105	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	<1,0x10	1,47x10 <sup>7</sup>	<1,0x10	1,68x10 <sup>7</sup>

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

No caso da indústria de alimentos e do presente trabalho, a avaliação de culturas seletivas possibilita a checagem quantitativa e qualitativa do micro-organismo alvo. A partir de uma amostra, é possível a contagem do grupo do micro-organismo alvo do estudo e sua comparação com o grupo maior, envolvendo todas as bactérias com comportamento mesófilo. Madigan *et al.* (2010), citam o uso de meios de cultura e condições seletivas de desenvolvimento como uma ferramenta que permite que se aprimore sobre espécies em particular, dentro de uma população mista de micro-organismos como é o caso, neste estudo, das bactérias ácido láticas dentro do grupo maior, de mesófilos totais.

Sendo assim, conforme observado na tabela 5, a partir do 45° dia de fabricação foram identificadas contagens tanto de bactérias ácido láticas, quanto de mesófilos totais, atingindo 10<sup>8</sup> UFC/g em amostras pontuais, sendo que este limiar foi identificado como média aos 60 dias de fabricação para as bactérias ácido láticas e 75 dias de fabricação para mesófilos totais, tendo comportamento bastante similar quando analisados os resultados individuais. Conforme mencionado por Franco e Landgraf (2008), a maioria dos alimentos apresenta características de deterioração e alterações organolépticas quando o número de micro-organismos é superior a 10<sup>6</sup> UFC/g. Porém, para determinados tipos de alimentos, como os produtos cárneos

industrializados, o que inclui a linguiça tipo calabresa, é necessário valores de  $10^7$  ou até mesmo  $10^8$  UFC/g de alimento.

Em contrapartida, o resultado satisfatório identificado tanto nas amostras tratadas, quanto nas amostras controle de linguiça tipo calabresa submetidas a temperatura de refrigeração, onde não ocorreram contagens elevadas de bactérias ácido lácticas, representam alternativas para a indústria de alimentos.

Adotando o descrito por Madigan *et al.* (2010), dentre os fatores que controlam o desenvolvimento de micro-organismos, quatro são essenciais: temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio.

Diante disso, pode-se afirmar que a temperatura de refrigeração, utilizada nas amostras sem aplicação de tratamento, foi eficaz no controle da multiplicação das bactérias ácido lácticas na linguiça tipo calabresa deste estudo, se mostrando apta ao consumo humano até o final do período avaliado. Esta correlação com a temperatura também foi citada por Pelczar, Chan e Krieg (2005), afirmando que este fator apresenta grande influência na multiplicação de bactérias e que todos os processos de multiplicação são dependentes de reações químicas, as quais sofrem interferência da temperatura aplicada. De modo geral, as bactérias geralmente podem crescer em ampla faixa de temperatura, sendo que para cada  $10^{\circ}\text{C}$  de elevação, há duplicação da taxa de multiplicação quando em temperaturas favoráveis.

As amostras de linguiça tipo calabresa que não receberam tratamento, porém foram mantidas em temperatura de até  $8^{\circ}\text{C}$ , não apresentavam temperatura ambiente favorável para o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas, com isso, o produto manteve sua aparência durante todo o período de avaliação. Isso pode ser identificado pelas imagens dispostas na figura 16, onde a superfície dos gomos se apresenta íntegra, com coloração característica, sem a formação de *slime* ou gás na embalagem.

Figura 16 - Superfície Íntegra – Amostras Controle de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de até 8°C



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Seguindo o uso da aplicação de temperatura controlada, o método mais comum utilizado para conservação de alimentos é a refrigeração, pois esta condição reduz a velocidade de multiplicação bacteriana. Porém, conforme relatado por Tortora, Funke e Case (2012), mesmo quando em temperatura de refrigeração, o tempo prolongado de contato, pode possibilitar a alteração do aspecto e sabor e a deterioração do

alimento por micro-organismos deteriorantes, estando as linguiças tipo calabresa sujeitas a esta alteração.

Outra dificuldade particularmente presente é a condição de armazenagem, durante o comércio da linguiça tipo calabresa. O mercado atual demanda de produto que possa ser mantido em temperatura ambiente, em decorrência da maior facilidade e praticidade tanto para transporte, quanto para o estoque e controle no ponto de venda. Desse modo, a aplicação de temperatura de refrigeração nem sempre é possível ou viável na comercialização desta categoria de alimento.

Um importante fator que auxilia no entendimento da baixa contagem de mesófilos totais e bactérias ácido lácticas observados nas amostras controle de linguiça tipo calabresa, submetidas a temperatura de armazenagem de 25°C +/-1 no dia 1 de fabricação, com elevação gradativa na contagem destes micro-organismos é a resistência a tratamento térmico citada por Franco e Landgraf (2008). Essa resistência também é explicada por Fontana, Cocconcelli e Vignolo (2006), e identificada pelo fato de logo após ser embalada a vácuo, a linguiça tipo calabresa apresentar bactéria ácido láctica abaixo do limite de detecção, sendo que estas aumentaram durante o armazenamento. Ou seja, há uma redução na microbiota em resposta ao tratamento térmico ao qual o produto foi submetido, justificando os valores inferiores ao limite de detecção de 1,0x10 UFC/g identificados neste estudo. Porém, essas bactérias não são eliminadas em sua totalidade, sendo que retomam a proliferação ao encontrar condições favoráveis, conforme observado nas linguiças a partir do 15° dia de fabricação.

Outra possibilidade que justifica a elevada contagem observada nas amostras controle de linguiça tipo calabresa, submetidas a temperatura de 25°C +/-1 é a contaminação da massa da linguiça a partir da condimentação utilizada na sua elaboração, como por exemplo o sal, açúcar, proteína de soja, além de outros ingredientes adicionados intencionalmente. Essa afirmação é justificada por estudo desenvolvido por Sade, Lassila e Björkroth (2016), que identificaram a presença de bactérias ácido lácticas em especiarias utilizadas na condimentação de alimentos. Do mesmo modo, Vermeiren *et al.* (2005), citaram a reprodução de *Leuconostoc citreum* e *Leuconostoc mesenteroides* em carnes curadas, identificados inicialmente em especiarias e vegetais secos, provocando viscosidade, gases e odores desagradáveis neste alimento.

A formação do líquido viscoso, esbranquiçado nas amostras controle de linguiça tipo calabresa mantidas a 25°C +/- 1 é resultado característico da ação e da elevada população das bactérias ácido lácticas presentes. O *Leuconostoc citreum* identificado pode ter sido um dos agentes que contribuíram para esta formação, pois conforme citado em trabalho de Lee *et al.* (2020), este micro-organismo é conhecido por causar deterioração em alimentos e bebidas. Sua produção de dextrana, importante fator deteriorante, leva à viscosidade em sucos de frutas.

Esta anomalia começou a ser observado nas amostras controle, submetidas a temperatura de 25°C +/-1 de modo sutil a partir do 45º dia de fabricação, se tornando mais evidente com o avançar dos dias e concomitante ao acréscimo na contagem destes micro-organismos, quando identificado em laboratório. Madigan *et al.* (2010), citam que ao longo de um determinado período da multiplicação exponencial de micro-organismos, a quantidade de bactérias presentes no alimento pode ser tão reduzida, que impede a observação de efeitos mensuráveis, apresentando sinais evidentes de deterioração somente nos últimos períodos de duplicação populacional. Desse modo, durante parte da multiplicação bacteriana não há alteração de fácil identificação no alimento, sendo observado somente quando a densidade populacional já é bastante elevada, compatível ao resultado da contagem obtida aos 45 dias de fabricação das linguiças, neste estudo.

Pequenas formações de líquido esbranquiçado já são observadas na superfície do gomo da linguiça tipo calabresa aos 45 dias de fabricação, conforme observado na figura 17. Esta condição foi se tornando mais evidente, até a formação de grande acúmulo de líquido aos 105 dias de fabricação, conforme destacado na mesma figura. Outra alteração evidente, identificada no 105º dia de fabricação é a coloração pálida à esverdeada do gomo, comprometendo sua aparência.

Figura 17 - Formação de *Slime* – Amostras Controle de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de 25°C +/-1

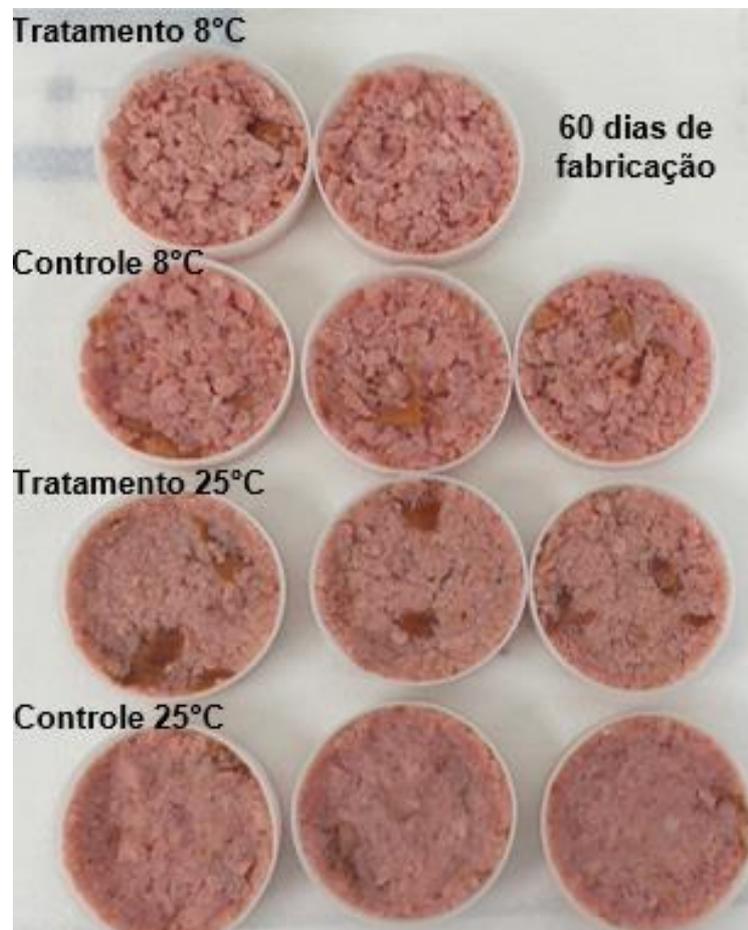


Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Aliado a isso e complementando a citação de Madigan *et al.* (2010), mencionada anteriormente, aos 60 dias de fabricação era possível identificar comprometimento na estrutura do produto mantido a 25°C +/-1, tanto nas amostras controle, quanto nas amostras submetidas ao tratamento. Desse modo, a alteração mais evidente observada na figura 18, ocorreu nas amostras controle de linguiça tipo calabresa, mantidas a 25°C +/-1, que apresentavam contagem elevada, porém, alteração similar foi observada nas amostras tratadas, onde não houve contagem, o que pode ser um indício de ação proteolítica ou bacteriana, mesmo quando em contagens reduzidas.

O produto apresentava estrutura mais frágil e amolecida, formando uma massa pastosa ao ser triturada. Este comportamento não foi observado nas amostras mantida em temperatura de refrigeração.

Figura 18 - Comparativo da Textura Apresentada Pelas Amostras de Linguiça Tipo Calabresa, aos 60 Dias de Fabricação.



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

A elevada contagem identificada para os mesófilos totais, pontualmente em amostra com 45 dias de fabricação e, como média, nas amostras com 75 dias, pode estar relacionada com a qualidade da matéria prima utilizada ou a fatores ambientais e de manipulação. Conforme comentado por Franco e Landgraf (2008), essa contagem de placas de bactérias aeróbias mesófilas é empregada comumente para indicar a qualidade sanitárias dos alimentos. Mesmo em situações em que o alimento esteja livre de patógenos e onde não houve alteração sensorial, a presença de contagem elevada pode indicar um alimento não apto para consumo (o que não se aplica em alimentos fermentados). Isso pode ocorrer por uso de matéria prima contaminada na elaboração do produto ou processamento com condições sanitárias insatisfatórias. Micro-organismos que não são patogênicos, como *Proteus*, enterococos e *Pseudomonas*, quando em número elevado, podem provocar casos de toxinfecção alimentar, fato preocupante visto a identificação do *Enterococcus devriesei* ao final do período de vida útil das linguças.

Outros fatores que contribuem de modo importante com a proliferação bacteriana é a disponibilidade de nutrientes, amplamente presente nas amostras de linguça tipo calabresa, bem como a condição proporcionada pelo ambiente, sendo ótima nas amostras mantidas em temperatura de 25°C +/-1. Madigan *et al.* (2010), relacionam a velocidade de multiplicação bacteriana a estes fatores. Ou seja, a multiplicação exponencial é dependente da temperatura e do valor nutritivo oferecido pelo alimento, sofrendo também interferência pelas propriedades do micro-organismo avaliado. Corroborando à qualidade da matéria prima citada por Franco e Landgraf (2008), Madigan *et al.* (2010), também relacionam o inóculo inicial como um fator que determina o tempo necessário para a densidade populacional do micro-organismo contaminante, alcançar um nível significativo.

O resultado oposto, identificado pela falta de multiplicação bacteriana observada nas amostras tratadas de linguça tipo calabresa, submetidas a temperatura de 25°C +/-1, comprova a eficácia do tratamento aplicado, já que ambas as condições tiveram o mesmo inóculo inicial e proporcionavam nutrientes e temperatura favoráveis para a multiplicação bacteriana, e este foi identificado apenas nas amostras que não receberam tratamento.

Este comportamento confirma a eficácia da ação concomitante entre os ácidos láctico e propiônico na inativação das bactérias ácido lácticas nas amostras de linguiça tipo calabresa tratadas, visto que não foi observado formação de limosidade na superfície dos gomos, bem como multiplicação e contagem nas análises laboratoriais.

Na figura 19, pode ser observada a comprovação da manutenção da aparência característica do produto pela aplicação do tratamento antimicrobiano, onde não houve formação de gás, produção ou acúmulo de líquido e nem mesmo comprometimento da coloração durante todo o período avaliado neste estudo.

Figura 19 - Superfície Íntegra – Amostras Tratadas de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de 25°C +/-1



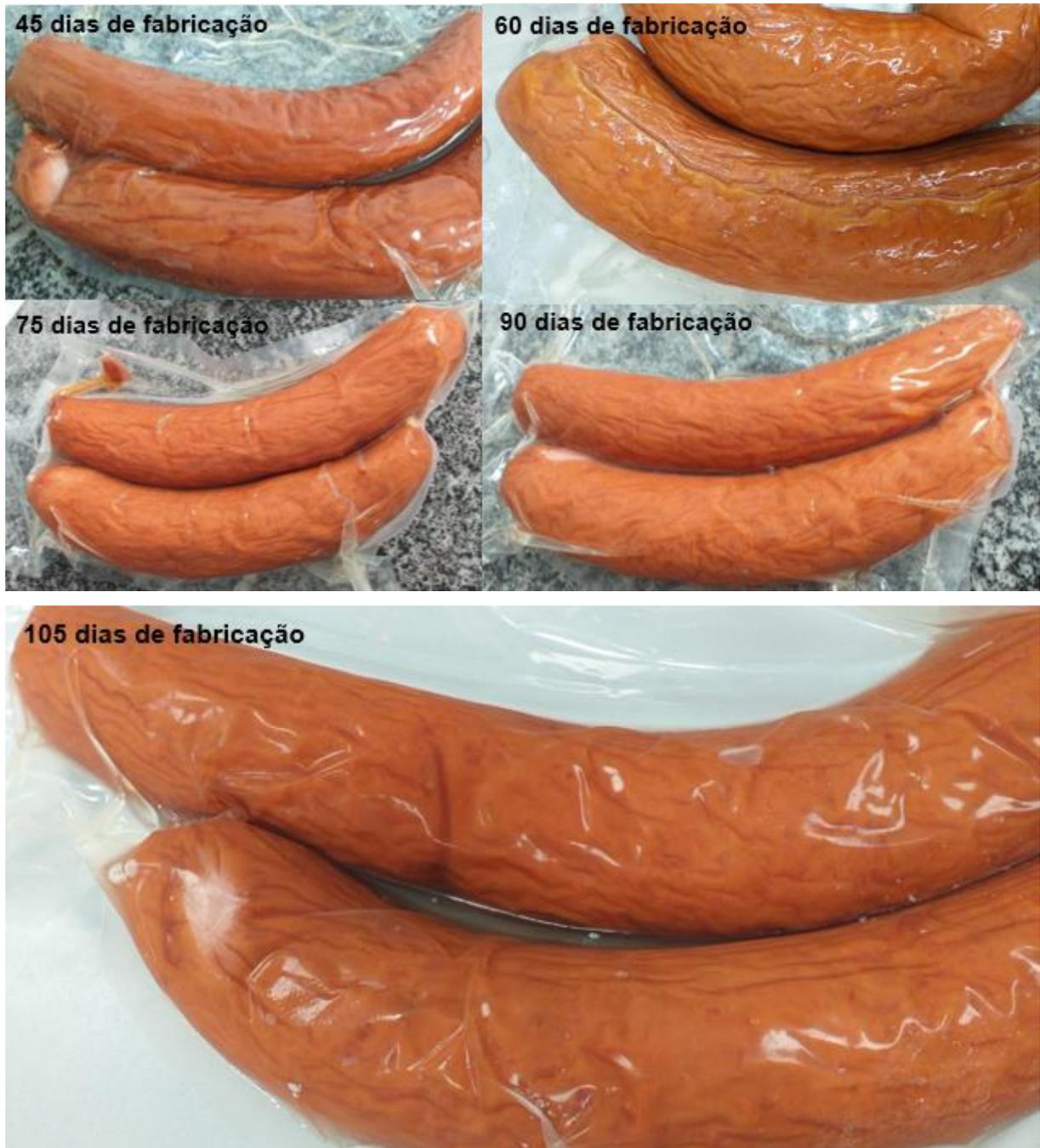


Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

Conforme já observado por Pelczar, Chan e Krieg (2005), os agentes antimicrobianos utilizados podem sofrer influência de diferentes fatores ambientais, bem como de características das células. Para avaliar a ação de um antimicrobiano, deve ser levado em consideração o tamanho da população microbiana, a temperatura em que os micro-organismos foram mantidos e expostos ao agente, a concentração e o tempo de ação do agente, assim como realizado neste estudo.

A combinação do tratamento e da temperatura de refrigeração, tiveram resultado tão satisfatório quanto ao da aplicação de tratamento, ou quanto ao uso da temperatura de refrigeração, quando aplicados isoladamente. Ou seja, não houve multiplicação de bactérias ácido lácticas durante todo o período avaliado, conforme resultados laboratoriais, nem o comprometimento das características aparentes, formação de *slime* ou alteração na cor, conforme evidenciado na figura 20. Nesta figura, pode ser observada a manutenção das características da linguiça tipo calabresa em todo o período do estudo.

Figura 20 - Superfície Íntegra – Amostras Tratadas de Linguiça Tipo Calabresa, Mantidas em Temperatura de até 8°C



Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

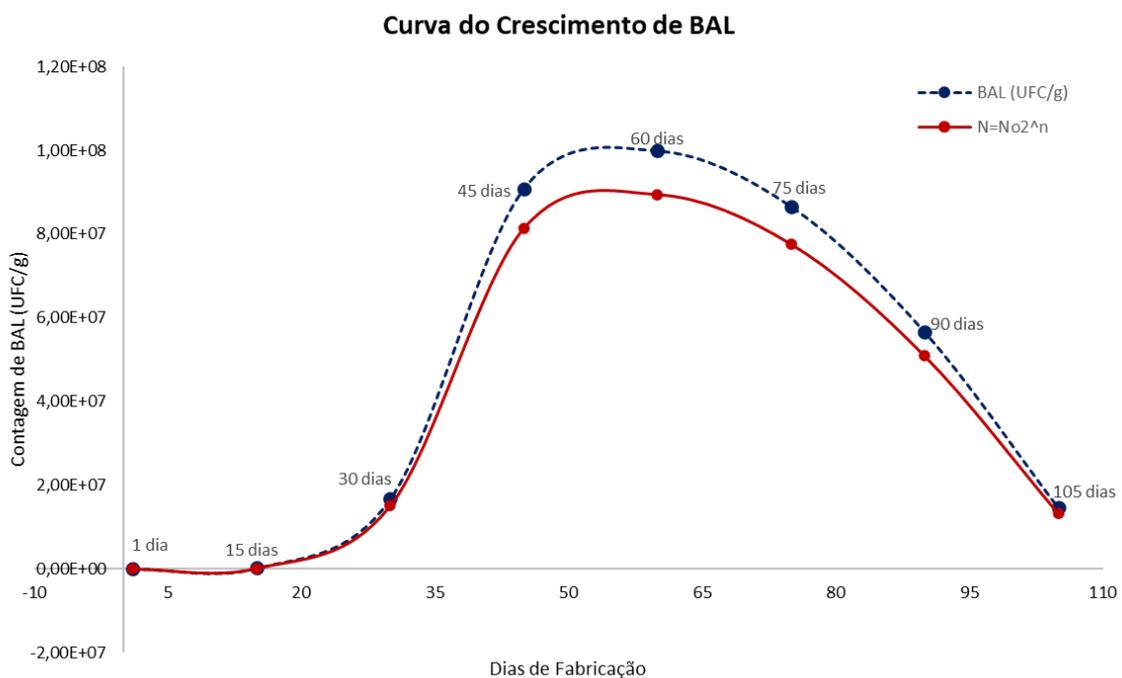
Sendo assim, tanto pelos resultados obtidos nas análises laboratoriais, quanto pela avaliação da aparência do produto, conclui-se que o tratamento antimicrobiano se mostrou tão eficaz, quanto a temperatura de refrigeração na conservação das linguiças tipo calabresa, impedindo a proliferação e atuação das bactérias ácido lácticas. A inocuidade do produto avaliado foi mantida até o fim do estudo (105 dias), o

que corresponde a um atendimento de 116,7% do período de vida útil praticado atualmente (90 dias). Sabe-se ainda que este resultado poderia ser prolongado, no entanto, períodos maiores que 105 dias não foram considerados neste estudo e que outros fatores, como a possível interferência no sabor, devem ser conceituados.

### 5.3.1 Curva de Multiplicação das Bactérias Ácido Láticas

A multiplicação das bactérias ácido láticas (BAL) obtida por meio das análises laboratoriais ao longo do período de 105 dias, está representada na figura 21. Nela, é possível identificar comportamento semelhante a curva de multiplicação bacteriana descrita por Tortora, Funke e Case (2012).

Figura 21 - Curva de Multiplicação de Bactérias Ácido Láticas pelo Tempo.



---●--- representa BAL (UFC/g) e —●— o ajuste pelo modelo matemático  $N = N_0 2^n$

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Analisando a figura 21, obtida no estudo, e comparando com a figura 01, extraída de Tortora, Funke e Case (2012), verifica-se que o período de adaptação e preparo, ou fase *lag*, é observado no gráfico, até próximo aos 15 dias de análises. Galarz, Fonseca e Prentice-Hernández (2010), identificaram ao avaliar carne de peito de frango *in natura* e com adição de sal, mantidas em temperatura de refrigeração, o

período de duração da fase *lag* de multiplicação bacteriana para mesófilos e psicrotróficos até o 6º dia de armazenamento, isso conduz a ideia de que para as bactérias ácido lácticas o comportamento nesta fase de adaptação e preparo para a multiplicação, é semelhante ao identificado por Galarz, Fonseca e Prentice-Hernández.

Por se tratar de produto *in natura*, a contagem máxima observada por Galarz, Fonseca e Prentice-Hernández (2010), foi identificada no 15º dia de fabricação, início da fase exponencial de multiplicação bacteriana, até 60º dia de fabricação. No caso das bactérias ácido lácticas, o modo de obtenção e cozimento ao qual as linguiças foram submetidas, postergaram a fase exponencial, atingindo seu ápice no 45º dia de fabricação.

Mantilla *et al.* 2011, também utilizaram carne de peito de frango em seu estudo, aplicando radiação na carne embalada a vácuo. Como resultado, identificaram que o tratamento prolongou a fase *lag*, estendendo o período de vida útil do alimento. De modo similar, o tratamento térmico das linguiças tipo calabresa pode ser o responsável por prolongar a fase *lag*, fazendo com que as bactérias demorem um tempo maior para retornarem à condição ótima de proliferação. As amostras de peito de frango mantidas em embalagem sem vácuo e que não foram irradiadas, resultaram em 5 dias de vida útil nas avaliações sensoriais e microbiológicas, enquanto as amostras embaladas a vácuo e que receberam radiação, se mantiveram aptas até o 12º dia de fabricação, mostrando ainda que o vácuo aplicado durante a embalagem das linguiças tipo calabresa também contribuiu com sua conservação.

Comportamento idêntico ao das linguiças tipo calabresa mantidas em temperatura de até 8°C, em que não houve multiplicação bacteriana, foi identificado por Silva *et al.* 2018. Em seu estudo, Silva *et al.* relacionaram a temperatura ambiente ao desenvolvimento de bactérias ácido lácticas e observaram que a duração da fase *lag* foi fortemente influenciada pela redução da temperatura até 4°C para os *Lactobacillus plantarum*, onde não ocorreu multiplicação. Para o *Lactobacillus sakei* e a *Weissella viridescens* a temperatura de 4°C provocou redução na taxa máxima de multiplicação. O incremento de temperatura para 12°C no estudo de Silva *et al.* elevou a taxa de multiplicação em 77% para *Lactobacillus plantarum*, 60% para a *Weissella viridescens* e 64% para o *Lactobacillus sakei*.

No presente estudo, a temperatura de 25°C das amostras controle de linguiça tipo calabresa proporcionou condições apropriadas para a rápida adaptação e preparo para a multiplicação bacteriana, já que esta é identificada ainda no início do gráfico. Esta capacidade de interferência e da adaptação ao meio e na taxa de multiplicação, pode ser a responsável pela ausência de desenvolvimento nas amostras controle mantidas até 8°C, dificultando a fase de adaptação das bactérias nas amostras que não receberam tratamento na superfície dos gomos.

Diferente do que foi observado na fase *lag* das linguiças tipo calabresa, a fase *log* apresentou comportamento de fácil identificação na figura 21 até o 60° de fabricação, quando a população atingiu limiares próximos a 8 log de UFC/g, resultado semelhante ao identificado para o peito de frango, ao atingir 15 dias de armazenagem. Esta diferença para o alcance da fase estacionária entre a linguiça tipo calabresa e o peito de frango *in natura*, comprovam a implicação do tratamento térmico na conservação das linguiças cozidas, conforme mencionado.

Após o 60° dia de fabricação a população de bactérias ácido lácticas nas linguiças tipo calabresa entrou em uma fase estacionária até aproximadamente o 70° dia, seguida do declive populacional. Em caso de continuidade do estudo, possivelmente seriam observados dados populacionais rapidamente decrescentes, conforme pode ser verificado até o 105° dia.

#### 5.4 COMPORTAMENTO FÍSICO-QUÍMICO

Do mesmo modo que realizado para a obtenção das amostras utilizadas para avaliação microbiológica, aos pacotes preparados para avaliação físico-química foram adicionadas 50 gramas do tratamento 1 (tabela 2), durante a etapa de embalagem, a cada quilograma de produto, na superfície dos gomos da linguiça tipo calabresa.

Posteriormente, tanto os pacotes que receberam o tratamento antimicrobiano, quanto os pacotes das amostras controle de linguiça tipo calabresa, foram selados a vácuo e armazenados em temperatura ambiente controlada de até 8°C e 25°C +/-1, sendo destinados para as avaliações cabíveis nos períodos de 1, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 105 dias de fabricação, conforme pré-determinado.

As análises quinzenais para determinação do pH e da atividade de água, nas amostras submetidas ao tratamento e amostras controle, em ambas as condições de temperatura ambiente, estão apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 - Comparativo do Comportamento Físico-Químico Quinzenal Entre as Amostras Tratadas e Amostras Controle de Linguiça Tipo Calabresa, nas Diferentes Condições de Temperatura de Armazenagem (até 8°C e 25°C +/-1).

Dias de Fabricação	Tratamento				Controle			
	pH		Aw		pH		Aw	
	8°C	25°C	8°C	25°C	8°C	25°C	8°C	25°C
1	5,35	5,86	0,963	0,951	5,66	5,62	0,961	0,960
15	4,18	3,38	0,953	0,955	5,95	5,75	0,957	0,963
30	3,94	3,84	0,954	0,959	5,69	5,47	0,958	0,958
45	3,43	3,55	0,959	0,958	5,74	5,85	0,963	0,964
60	3,61	3,30	0,955	0,947	5,50	5,63	0,952	0,952
75	3,98	3,34	0,957	0,952	5,80	5,92	0,953	0,950
90	3,78	3,17	0,959	0,956	5,70	5,72	0,960	0,959
105	3,67	3,57	0,954	0,959	5,89	5,10	0,964	0,962

Fonte: Elaborada pelo autor (2021).

O grupo de bactérias ácido lácticas compreendem cerca de 530 espécies e subespécies, o que condiciona seu pH ótimo de multiplicação. Pelczar, Chan e Krieg (2005), afirmam que o pH ótimo para a multiplicação bacteriana é definido pelo valor mediano da variação sobre a qual a multiplicação é capaz de ocorrer. Cada espécie normalmente apresenta um pH ótimo bem definido para desenvolvimento. Porém, para um desenvolvimento adequado em meios de pH extremos, o micro-organismo deve ser capaz de manter seu pH intracelular em torno de 7,5, independente do índice externo. Esse controle é realizado pela expulsão ou absorção de íons hidrogênio.

O grupo do ácido láctico compreende micro-organismos capazes de resistir a pH bastante ácido, condição pouco tolerável a outros agentes. Madigan *et al.* (2010), citam que os alimentos diferem entre si em relação ao pH, porém, a maioria é de natureza neutra ou ácida. Cada micro-organismo apresenta característica diferente quanto a capacidade de crescer em condições ácidas, sendo que a maioria dos agentes deteriorantes são inibidos em condições de pH inferior a 5. Isso justifica o

grupo das ácido láticas ser o responsável pela deterioração da linguiça tipo calabresa, já que outras bactérias dificilmente sobrevivem a esta condição

Tortora, Funke e Case (2012), identificaram que poucas bactérias são capazes de crescer em pH baixo, como 4,0. Em decorrência disto, alimentos como chucrute, pepino em conserva e diferentes tipos de queijo, não sofrem com deterioração, já que os ácidos produzidos durante a fermentação contribuem para a sua proteção. No entanto, bactérias acidófilas resistem a pH ácido, contribuindo com a redução da vida útil do alimento. A alcalinidade é um fator que também contribui para inibir a multiplicação bacteriana, porém raramente é utilizada com a finalidade de preservação de alimentos.

No estudo em questão, foi testado o efeito da interação tripla entre grupos, temperaturas e dias de fabricação. Quando a interação tripla é não significativa ( $p > 0,05$ ), observa-se as interações duplas. Somente foram avaliados os fatores isoladamente, quando nenhuma interação era significativa

Tabela 7 - Análise de Variância: pH

	<b>Temperatura 8°C</b>	<b>Temperatura 25°C</b>	<b>p-valor</b>
Controle	5,74 <sup>Aa</sup>	5,63 <sup>Aa</sup>	0,1050
Tratamento	3,99 <sup>Ba</sup>	3,75 <sup>Bb</sup>	0,0002
p-valor	<0,0001	<0,0001	

Médias seguidas por letras maiúsculas/minúsculas diferentes na mesma coluna/linha diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Fisher-Snedecor.

Tabela 8 - pH (Controle X Tratamento)

<b>Dias de Fabricação</b>	<b>Controle</b>	<b>Tratamento</b>	<b>p-valor</b>
1	5,64	5,60 <sup>A</sup>	0,7709
15	5,85 <sup>a</sup>	3,78 <sup>Bb</sup>	<0,0001
30	5,58 <sup>a</sup>	3,89 <sup>Bb</sup>	<0,0001
45	5,79 <sup>a</sup>	3,49 <sup>Bb</sup>	<0,0001
60	5,56 <sup>a</sup>	3,45 <sup>Bb</sup>	<0,0001
75	5,86 <sup>a</sup>	3,66 <sup>Bb</sup>	<0,0001
90	5,71 <sup>a</sup>	3,47 <sup>Bb</sup>	<0,0001
105	5,49 <sup>a</sup>	3,62 <sup>Bb</sup>	<0,0001

p-valor	0,0525	<0,0001
---------	--------	---------

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ( $P<0,05$ ) entre si pelo teste de Fisher-Snedecor. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem ( $P<0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

Tabela 9 - pH (Temperatura 8°C X Temperatura 25°C)

Dias de Fabricação	Temperatura 8°C	Temperatura 25°C	p-valor
1	5,50 A	5,74 A	0,0815
15	5,07 ABa	4,57 Bb	0,0002
30	4,82 BC	4,65 B	0,2170
45	4,58 C	4,70 B	0,3625
60	4,55 C	4,46 B	0,4424
75	4,89 BCa	4,63 Bb	0,0346
90	4,74 BCa	4,44 Bb	0,0169
105	4,78 BCa	4,33 Bb	0,0012
p-valor	<0,0001	<0,0001	

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ( $P<0,05$ ) entre si pelo teste de Fisher-Snedecor. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem ( $P<0,05$ ) entre si pelo teste de Tukey.

Não foi identificada interação na análise de pH das amostras entre os grupos (controle e tratamento), temperaturas e dias de fabricação, e este fator não impactou nos resultados obtidos.

As amostras tratadas apresentaram pH de ordem decrescente ao longo do período avaliado, enquanto as amostras controle de linguiça tipo calabresa se mostraram estáveis. Este comportamento não foi decorrente da ação e metabolismo das bactérias ácido lácticas, já que estas mantiveram contagens baixas nas amostras tratadas, mas sim, da composição do tratamento, formado pelos ácidos láctico e propiônico, interferindo diretamente no meio ao qual foi aplicado, protegendo o produto de agentes patogênicos e deteriorantes, não resistentes a esta condição e acidificando o meio em contato.

Madigan *et al.* (2010), define a disponibilidade de água, expressa como atividade de água ( $A_w$ ), como a razão entre a pressão de vapor do ar em equilíbrio com uma solução, em relação à pressão de vapor da água pura. A disponibilidade de água não depende somente do conteúdo de água presente, mas sim, da quantidade de solutos dissolvidos na água. Quanto maior a quantidade de soluto, maior a

competição entre as células microbianas e o soluto, pela quantidade de água livre. De modo geral, as bactérias são fracas competidoras pela água remanescente.

A análise de variância indicou que houve interação para a avaliação da atividade de água entre temperaturas de armazenamento e dias de estocagem, independente do grupo (controle ou tratado).

Tabela 10 - Análise de Variância: Aw

Temp °C	Dias de Fabricação							
	1	15	30	45	60	75	90	105
8	0,962 <sup>A</sup>	0,955	0,956	0,961	0,954	0,955	0,959	0,959
25	0,955 <sup>Babc</sup>	0,959 <sup>ab</sup>	0,959 <sup>ab</sup>	0,961 <sup>a</sup>	0,949 <sup>c</sup>	0,951 <sup>bc</sup>	0,957 <sup>abc</sup>	0,960 <sup>a</sup>

Médias seguidas por letras maiúsculas/minúsculas diferentes, na mesma coluna/linha, diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo teste de Fisher-Snedecor/Tukey.

Porém, apesar de a análise indicar que o grupo controle apresentou maior atividade de água do que o grupo tratado, não houve variação no teor de solutos das amostras de linguiça tipo calabresa controle e tratadas analisadas, já que ambas seguiram a mesma formulação padrão. Desse modo, a atividade de água não representou, neste estudo, uma propriedade com interferência no comportamento bacteriano e se mostrou estável em todas as condições as quais a linguiça foi submetida, durante todo o período avaliado.

De modo geral, atividade de água superior a 0,900 oferece condição favorável ao desenvolvimento de micro-organismos. Sendo assim, a atividade de água no presente estudo se apresentou ideal ao desenvolvimento das bactérias ácido lácticas para todas as condições as quais a linguiça tipo calabresa foi submetida e não correspondeu a um fator limitante para a proliferação de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes, não podendo ser utilizada como justificativa para o comportamento bacteriano observado em cada condição testada.

## 6 CONCLUSÃO

As bactérias ácido lácticas desempenham atividade controversa na indústria de alimentos. Apesar de serem intencionalmente aplicadas para maturação e desenvolvimentos de sabores e odores em derivados lácteos e em conservas, são também os mais importantes agentes deteriorantes de produtos cárneos, causando desperdícios e perdas econômicas.

Em decorrência disso, o uso de aditivos antimicrobianos que retardem a ação destas bactérias é visto como uma alternativa promissora na indústria de alimentos, principalmente aqueles de origem natural.

No presente estudo, o ácido láctico e o ácido propiônico, compondo uma fumaça líquida, tiveram efeito positivo pela aplicação na superfície dos gomos, impedindo o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas e contribuindo com a conservação da linguiça tipo calabresa.

Este método apresenta fácil aplicação em nível industrial e baixo custo, porém, o uso de aditivos pode comprometer o sabor e odor do alimento, descaracterizando um produto já consolidado no mercado e provocando a recusa de clientes fidelizados.

Representando um método menos invasivo, a refrigeração da linguiça tipo calabresa e a manutenção da cadeia de frio durante o período de vida útil deste alimento, também se mostrou eficiente no controle de organismos deteriorantes.

Este método é o mais indicado quando se trata de manutenção do sabor e odor característicos do produto. No entanto, é um método caro e dependente de fatores externos à indústria, visto a necessidade da manutenção do frio durante toda a logística, distribuição e permanência do produto no ponto de venda, tendo, portanto, baixa possibilidade de aplicação para esta categoria de alimento.

A multiplicação bacteriana neste estudo confere com o modelo descrito por Tortora, Funke e Case (2012), ou seja, bactérias ácido lácticas presentes em linguiças cozidas tipo calabresa, já tratadas termicamente e com inibidores na superfície dos gomos, seguem o modelo apresentado de multiplicação.

De modo geral, tanto a aplicação do tratamento, quanto o uso de temperatura de refrigeração foram eficientes no retardo à deterioração e no controle da proliferação de bactérias ácido lácticas do produto durante todo o período do estudo, correspondendo a 116,7% do tempo de vida útil praticado atualmente. Esta condição

representa ganho para a empresa fabricante, visto maior disponibilidade de tempo na vida útil, de distribuição, comercialização e consumo das linguiças cozidas, além da redução nas ocorrências de insatisfação de clientes.

Verificado ainda, variação nas espécies de bactérias ácido lácticas presentes no produto ao longo do seu período de vida útil. Confirmada a relação com produtos cárneos cozidos, embalados a vácuo, de micro-organismos já descritos como *Lactobacillus sakei* e *Leuconostoc citreum*, entretanto, identificados micro-organismos de baixa relação prévia com alimentos, representados pelo *Enterococcus devriesei* e *Staphylococcus hominis*.

Cada espécie de bactéria ácido láctica identificada pode apresentar interesse quando devidamente aplicado. Para tanto, a condução de novos estudos é necessária para esclarecer e assegurar o uso controlado e intencional dos agentes e das bacteriocinas originadas. Alternativas inovadoras despertam grande interesse pelas indústrias de alimentos e o *Enterococcus devriesei*, identificado neste estudo, caracteriza uma bactéria com ampla possibilidade de exploração devido a produção da ainda pouco conhecida, enterocina.

## REFERÊNCIAS

- ADITIVOS E INGREDIENTES. **Conservação de Alimentos por Aditivos Químicos**. São Paulo: Insumos Ltda, v. 63, jul e ago 2009. Disponível em: [https://revista-fi.com.br/upload\\_arquivos/201606/2016060607896001464976217.pdf](https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060607896001464976217.pdf). Acesso em: 23 maio 2020.
- ANVISA. **Guia Para Determinação de Prazos de Validade de Alimentos**. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5056443/Guia+16\\_2018+Prazo+de.pdf/e40032da-ea48-42ff-ba8c-a9f6fc7af7af](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5056443/Guia+16_2018+Prazo+de.pdf/e40032da-ea48-42ff-ba8c-a9f6fc7af7af). Acesso em: 23 maio 2020.
- ALCANTARA, M. DE; CRISTINA, I.; MORAIS, L. DE. Artigo Científico. p. 1–18, 2012. DOI: 10.5935/1981-2965.20120001. Disponível em: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/15>. Acesso em: 23 maio 2020.
- ASAE. **Outros Aditivos**. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/outros-aditivos.aspx>. Acesso em: 30 outubro 2021.
- ASSIS, A. A. R.; VALADÃO, G. E. S.; CISALPINO, P.S. Levantamento da Curva de Crescimento da Bactéria *M. Phlei* para Obtenção de Biomassa em Ensaios de Separação Sólido-Líquido. **ENTME**, v. 24, 2011. Disponível em: [https://www.artigos.entmme.org/download/2011/separa%C3%A7%C3%A3o\\_s%C3%B3lido-l%C3%ADquido/2251%20-%20A.A.R.%20Assis\\_G.E.S.%20Valad%C3%A3o\\_P.S.%20Cisalpino%20-%20LEVANTAMENTO%20DA%20CURVA%20DE%20CRESCIMENTO%20DA%20BACT%3%89RIA%20M.%20PHLEI%20PARA%20OBTEN%C3%87%C3%83O%20DE%20BIOMASSA%20EM%20ENSAIOS%20DE%20SEPARA%C3%87%C3%83O%20S%C3%93LIDO-L%3%8DQUIDO.pdf](https://www.artigos.entmme.org/download/2011/separa%C3%A7%C3%A3o_s%C3%B3lido-l%C3%ADquido/2251%20-%20A.A.R.%20Assis_G.E.S.%20Valad%C3%A3o_P.S.%20Cisalpino%20-%20LEVANTAMENTO%20DA%20CURVA%20DE%20CRESCIMENTO%20DA%20BACT%3%89RIA%20M.%20PHLEI%20PARA%20OBTEN%C3%87%C3%83O%20DE%20BIOMASSA%20EM%20ENSAIOS%20DE%20SEPARA%C3%87%C3%83O%20S%C3%93LIDO-L%3%8DQUIDO.pdf). Acesso em: 16 abril 2022.
- BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025. Disponível em: <https://tarjomefa.com/wp-content/uploads/2018/05/TarjomeFa-F664-English.pdf>. Acesso em: 27 junho 2020.
- BOEIRA, C. P. et al. Extraction of bioactive compounds of lemongrass, antioxidant activity and evaluation of antimicrobial activity in fresh chicken sausage. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 11, 2018. DOI: 10.1590/0103-8478cr20180477. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/94pQkYBWntCcTV98ydg3SKJ/?lang=en>. Acesso em: 30 outubro 2021.
- BORCH, E.; MUERMANS, M. L. K.; BLIXT, Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 103-120, 1996. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01135-X. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/016816059601135X?via%3Dihub>. Acesso em: 23 maio 2020.

BORTOLOTTO, F. C. K. et al. Nisin and  $\epsilon$ -poly-L-lysine as natural antimicrobials towards spoilage-associated *Lactobacillus plantarum*. **Ciencia Rural**, v. 51, n. 2, p. 1–7, 2021. DOI: 10.1590/0103-8478cr20200423. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/NjmT4L6TWQK99NqHfn3d4sp/?lang=en>. Acesso em: 13 fevereiro 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria da Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº4, de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça. Publicado no Diário Oficial da União de 05/04/2000. Disponível em: <https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-4-de-31-03-2000,662.html>. Acesso em: 13 fevereiro 2021.

CAMPÊLO, M. C. DA S. et al. Use of natural preservatives in low sodium carne-de-sol beef. **Journal of Food Safety**, v. 37, n. 4, 2017. DOI: 10.1111/jfs.12347. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/jfs.12347>. Acesso em: 30 outubro 2021.

CAVALHEIRO, C. P. et al. Physical hazards in meat products: Consumers' complaints found on a Brazilian website. **Food Control**, v. 108, n. September 2019, p. 106892, 2020. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106892. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713519304815>. Acesso em: 20 junho 2020.

DE BARROS, J. R.; KUNIGK, L.; JURKIEWICZ, C. H. Incorporation of nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vacuum packaged sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1001–1008, 2010. DOI: 10.1590/S1517-83822010000400019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/DRyF5nsJfwZT8zNgf77PHrg/?lang=en>. Acesso em: 21 abril 2020.

DE CASTILHO, N. P. A.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. Molecular screening of beneficial and safety determinants from bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal calabresa. **Letters in Applied Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 204–211, 2019. DOI: 10.1111/lam.13194. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/334091296\\_Molecular\\_screening\\_of\\_beneficial\\_and\\_safety\\_determinants\\_from\\_bacteriocinogenic\\_lactic\\_acid\\_bacteria\\_isolated\\_from\\_Brazilian\\_artisanal\\_calabresa](https://www.researchgate.net/publication/334091296_Molecular_screening_of_beneficial_and_safety_determinants_from_bacteriocinogenic_lactic_acid_bacteria_isolated_from_Brazilian_artisanal_calabresa). Acesso em: 20 abril 2020.

DE SOUSA, R. M. S.; SERRA, I. M. R. DE S.; DE MELO, T. A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 1, p. 42–47, 2012. DOI: 10.1590/S0100-54052012000100007. Disponível em: <https://ifst-onlinelibrary-wiley.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/ijfs.14000>. Acesso em: 01 novembro 2021.

DE OLIVEIRA, T. L. C. et al. Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 357–365, 2013. DOI: 10.1590/S1517-83822013005000040. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/bjm/a/HmbFHDYhMCC5xxJ3grr8xHQ/?lang=en>. Acesso em: 27 junho 2020.

DO AMARAL, D. S. et al. Low fat goat meat sausage with chitosan-glucose maillard reaction product: Impact on quality and shelf life. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 132–139, 2020. DOI: 10.1590/fst.34018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/NcB35W3ywYHxxJx8XZn4Jyf/?lang=en>. Acesso em: 26 março 2020.

EECKHAUT, V. et al. Clostridium novyi type B as a causative agent of bovine meat spoilage. **Anaerobe**, v. 18, n. 3, p. 286–288, 2012. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2012.03.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22710414/>. Acesso em: 26 abril 2020.

ELIAS, M.; SANTOS, A. C.; RAPOSO, B. Caracterização de matérias-primas subsidiárias usadas no fabrico de paio de porco alentejano Secondary raw material characteristics used in traditional Portuguese dry sausage production. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 424–438, 2007. Disponível em: <https://revistas.rcaap.pt/rca/article/view/15435/12666>. Acesso em: 29 março 2020.

EL-NASHI, et al. Quality characteristics of beef sausage containing pomegranate peels during refrigerated storage. **Annals of Agricultural Science**, v. 60, n. 2, p. 403–412. DOI:10.1016/j.aoas.2015.10.002. Disponível em: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0570178315000378?token=AF3453B7D5BF846B455C96AD2F345A341BDE041456A6CD8E519727F2FFF7E96FCD6F158CB0053C750DCD4C77953F95AF&originRegion=us-east-1&originCreation=20220130191154>. Acesso em: 26 março 2020.

EMBRAPA. **Qualidade da carne suína**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-suina>>. Acesso em: 26 abril 2020.

EMBRAPA. **Manual de Curadores de Germoplasma - Microrganismos: Bactérias Ácido Láticas**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2005846/doc336-151.pdf/4c82dbc8-73bd-4689-a47e-5819e3f1ffc7>>. Acesso em: 27 junho 2021.

EMBRAPA. **Central de Inteligência de Aves e Suínos - Estatísticas e Desempenho de Produção**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 10 novembro 2021.

FERNANDES, V. R. T. et al. Yacare caiman (Caiman yacare) trim hamburger and sausage subjected to different smoking techniques. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 468–472, 2014. DOI: 10.1002/jsfa.6270. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/jsfa.6270>. Acesso em 29 outubro 2021.

FONTANA, C.; COCCONCELLI, P. S.; VIGNOLO, G. Direct molecular approach to monitoring bacterial colonization on vacuum-packaged beef. **Applied and**

**Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5618–5622, 2006.

DOI: 10.1128/AEM.00029-06. Disponível em:

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.00029-06>. Acesso em: 15 agosto 2021.

FORSYTHE, S. J.; HAYES, P.R. **Food Hygiene, Microbiology and HACCP**. 3ed. New York: Springer Science+Business Media, 2000.

FRANCO, B. D. G. N.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FREIBERGER, R. C. P. et al. Utilização de ácidos orgânicos como conservantes em linguiças curadas cozidas embaladas a vácuo. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 23, n. 2, p. 883, 2016. DOI: 10.20396/san.v23i2.8643983. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/311866896\\_Utilizacao\\_de\\_acidos\\_organico\\_s\\_como\\_conservantes\\_em\\_linguiças\\_curadas\\_cozidas\\_embaladas\\_a\\_vacu](https://www.researchgate.net/publication/311866896_Utilizacao_de_acidos_organico_s_como_conservantes_em_linguiças_curadas_cozidas_embaladas_a_vacu). Acesso em: 29 março 2020.

FREIRE ARAÚJO, T. et al. Prospecção Científica e Tecnológica do Uso do Óleo de Coco (*Cocos nucifera*. L) na Indústria Alimentícia. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 3, p. 875–887, 2020.

FUCHS GEWÜRZE DO BRASIL LTDA. **Fumaças Líquidas na Prevenção da Oxidação de Produtos cárneos**. Disponível em: <<https://aditivosingredientes.com.br/artigos/carnes/fumacas-liquidadas-na-prevencao-da-oxidacao-de-produtos-carneos>>. Acesso em: 28 junho 2020.

GALARZ, L. A.; FONSECA, G. C.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Crescimento Microbiano em Produtos à Base de Peito de Frango Durante Simulação da Cadeia de Abastecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 870-877, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/df8C9rrH3jywKfjWFPgKfKP/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 13 fevereiro 2022.

GEITENES, S. et al. Modelagem do Crescimento de Bactérias Lácticas e Análise Microbiológica em Apresuntado e Presunto Cozido Fatiados e Embalados a Vácuo Growth Modeling of Lactic Acid Bacteria and Microbiological Analysis in Two Types of Sliced Vacuum Package Cooked Ham Intr. **Revista Ciências Exatas e Naturais - RECEN**, v. 15, n. 1, p. 113–133, 2013. DOI: 10.5935/RECEN.2013.01.07. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/285978748\\_Modelagem\\_do\\_crescimento\\_de\\_bacterias\\_laticas\\_e\\_analise\\_microbiologica\\_em\\_apresuntado\\_e\\_presunto\\_cozido\\_o\\_fatiados\\_e\\_embalados\\_a\\_vacu](https://www.researchgate.net/publication/285978748_Modelagem_do_crescimento_de_bacterias_laticas_e_analise_microbiologica_em_apresuntado_e_presunto_cozido_o_fatiados_e_embalados_a_vacu). Acesso em: 29 março 2020.

GRISI, T. C. S. D. L.; GORLACH-LIRA, K. Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 151–156, 2005. DOI: 10.1590/S1517-83822005000200010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/ZkXpvZKLZGXcf59tTnjcXtz/?lang=en>. Acesso em 30 outubro 2021.

GÓMEZ CÁRDENAS, L. et al. Efecto de antimicrobianos naturales sobre la estabilidad físico-química, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res mantenidas en refrigeración. Effects of natural antimicrobials on microbiological stability, pH, aspect and sensory properties of. **Revista mexicana ciencia pecuaria**, v. 4, n. 486, p. 256, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242013000300001](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242013000300001). Acesso em: 31 outubro 2021.

GONZÁLEZ-FANDOS, E.; HERRERA, B. Efficacy of propionic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 601–606, 2013. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2007.01673.x. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/263494942\\_Efficacy\\_of\\_malic\\_acid\\_against\\_Listeria\\_monocytogenes\\_attached\\_to\\_poultry\\_skin\\_during\\_refrigerated\\_storage](https://www.researchgate.net/publication/263494942_Efficacy_of_malic_acid_against_Listeria_monocytogenes_attached_to_poultry_skin_during_refrigerated_storage). Acesso em: 20 junho 2020.

HOLLAND, R.; LIU, S. Q. Lactic Acid Bacteria, *Leuconostoc* spp. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2ed, p. 138-142, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00267-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744074002673#!>. Acesso em: 19 setembro 2021.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. SUPPL. 1, 1998. DOI: 10.1016/S0309-1740(98)90044-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174098900444>. Acesso em: 29 março 2020.

ISO 15214:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony count technique at 30°C.

IVAMI. ***Leuconostoc* spp., *Leuconostoc citreum* y otras especies. Importancia em la industria alimentaria: Aislamiento em cultivo; Diagnostico molecular (PCR)**. Disponível em: <https://www.ivami.com/es/microbiologia-de-alimentos/638-leuconostoc-spp-leuconostoc-citreum-y-otras-especies-importancia-en-la-industria-alimentaria-aislamiento-en-cultivo-diagnostico-molecular-pcr>. Acesso em: 19 setembro 2021.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food Microbiology**. 7ed. New York: Springer, 2005.

JENKO, C. et al. Refrigerated storage of pork meat sprayed with rosemary extract and ascorbic acid. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 4, 2018. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170238. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/TR8vL9CgYCMVWVSkGR6bpPN/?lang=en>. Acesso em: 28 março 2020.

KALSCHNE, D. L. et al. Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in “sliced vacuum-packed cooked ham”. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p.

173–181, 2015. DOI: 10.1590/S1517-838246120130019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/dcnbsqWKmbKFgsW5xczHCbP/?lang=en>. Acesso em: 22 março 2020.

LEE, S. et al. Synergistic antimicrobial activity of oregano and thyme thymol essential oils against *Leuconostoc citreum* in a laboratory medium and tomato juice. **Food Microbiology**, v. 90, n. March, p. 103489, 2020. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103489. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0740002020300782> Acesso em: 19 setembro 2021.

LI, C. U. et al. *Enterococcus xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1012-1017, 2014. DOI: 10.1099/ijs.0.058917-0. Disponível em: [https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/64/3/1012\\_ijs058917.pdf?expires=1643238562&id=id&accname=guest&checksum=BA6E8AA91FB4C82BB25881858EA79C6D](https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/64/3/1012_ijs058917.pdf?expires=1643238562&id=id&accname=guest&checksum=BA6E8AA91FB4C82BB25881858EA79C6D). Acesso em: 26 janeiro 2022.

LUCINI, M. A. et al. Avaliação da qualidade tecnológica de envoltório natural suíno utilizado no processamento de lingüiça Toscana. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 831–836, 2009. DOI: 10.1590/S1413-70542009000300023. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/QkGYn7bmJ7dfShjdtYvfWLv/abstract/?lang=pt> Acesso em: 27 junho 2020.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAIA JUNIOR, J. DE A. et al. Sensory attributes and lipid oxidation of smoked lamb sausage formulated with passion fruit meal, potassium chloride and calcium chloride. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 423–429, 2020. DOI: 10.1590/fst.02419. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/SRpn6RHVN6W4jmtrLCHkFMS/?lang=en>. Acesso em: 22 agosto 2020.

MANTILLA, S. P. S. et al. Microbiology, Sensory, Evaluation and Shelf Life of Irradiated Chicken Breast Fillets Stored in Air Vacuum. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 3, p. 569-576, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/hQYykCgwyXDHPY3XgRRR5Gf/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 13 fevereiro 2022.

MARTÍN-PLATERO, A. M. et al. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, n. 1, p. 24–32, 2009. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.010. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0168160509001603>. Acesso em: 18 dezembro 2021.

METRI, J. C. et al. Controle bacteriológico de carne caprina para elaboração de hambúrguer caprino defumado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 427–431, 2006. DOI: 10.1590/S0102-09352006000300022. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/x7JB6bQDsJqRHsPtM4zpYtP/?lang=pt>. Acesso em 30 outubro 2021.

MILKPOINT. **Bactérias ácido lácticas: principais características e aplicações em alimentos**. Disponível em < <https://www.milkpoint.com.br/colunas/claucia-fernanda-souza/bacterias-acidolacticas-principais-caracteristicas-e-aplicacoes-tecnologicas-em-alimentos-105118n.aspx> >. Acesso em: 27 junho 2021.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility tests; Approved Standard Eighth NCCLS**. Document M2-A8. Wayne, Pennsylvani, USA, 2003.

OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Revisão: Aspectos Gerais das Bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n., p. 267-276, 2015. DOI: [doi.org/10.1590/1981-6723.2215.5](https://doi.org/10.1590/1981-6723.2215.5). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/RWbydrVtbsPYBCcvphpKrvS/?lang=pt>. Acesso em: 17 junho 2022.

OLATUNDE, O. O.; BENJAKUL, S.; VONGKAMJAN, K. Coconut husk extract: antibacterial properties and its application for shelf-life extension of Asian sea bass slices. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 3, p. 810–822, 2019. DOI: [10.1111/ijfs.14000](https://doi.org/10.1111/ijfs.14000). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/3VjFjPJ5Sj3FBgxPnkhxktz/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 21 novembro 2021.

ORSOLIN, D. et al. Redução do tempo no processo de cozimento de mortadela e avaliação da qualidade final do produto. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 16, n. 4, p. 589–597, 2015. DOI: [10.1590/1089-6891v16i430548](https://doi.org/10.1590/1089-6891v16i430548). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cab/a/SnCGLZSMr9hRfJyQkFMcFNt/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 07 junho 2020.

PAUER, H. et al. *In*: FAINTUCH, Joel; FAINTUCH, Salomao. Microbiome and Metabolome in **Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications**. Book, 2019. p. 115-125. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128152492000129>. Acesso em: 15 dezembro 2021.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**. 2ed. São Paulo: Pearson Education, 2005.

POFFO, F.; ADONAI, M. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho Taxonomic and physiological characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2010, n. 003744, p. 303–307, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/jhsmVmLGrNxY4b3s65C6Y8F/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 07 junho 2020.

POTHAKOS, V. et al. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat Science**, v. 109, p. 66–74, 2015. DOI:

10.1016/j.meatsci.2015.04.014. Disponível em:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25972087/>. Acesso em: 07 junho 2020.

RAIMUNDO, L. M. B.; BATALHA, M. O. Mercado de carne suína na cidade de São Paulo: segmentos e estratégias. **Gestao e Producao**, v. 22, n. 2, p. 391–403, 2015. DOI: [dx.doi.org/10.1590/0104-530X1240-14](https://doi.org/10.1590/0104-530X1240-14). Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/gp/a/PMRDDYgk9DPdxx4hJdmMsgb/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 23 maio 2020.

RAMOS, K.; ANDREANI JUNIOR, R.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 605–612, 2016. DOI: 10.1590/1983-084X/15\_192. Disponível em:  
<https://www.scielo.br/j/rbpm/a/hFM4hB5nFXmnzLfJJ5nKwzx/?lang=pt>. Acesso em: 31 outubro 2021.

RIVAS, F. P. et al. Natural and artificial casings as bacteriocin carriers for the biopreservation of meats products. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 1, 2018. DOI: 10.1111/jfs.12419. Disponível em: <https://www.mendeley.com/catalogue/e19ef2b9-3259-3fc1-bf3e-30f31b966489/>. Acesso em: 27 junho 2020.

RUBIO, R. et al. Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 158–165, 2013. DOI: [//dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.012](https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.012). Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0740002012002043>. Acesso em: 18 dezembro 2021.

RUSSO, F. et al. Behaviour of *Brochothrix thermosphacta* in presence of other meat spoilage microbial groups. **Food Microbiology**, v. 23, p. 797-802. Disponível em: [https://www.academia.edu/10097860/Behaviour\\_of\\_Brochothrix\\_thermosphacta\\_in\\_presence\\_of\\_other\\_meat\\_spoilage\\_microbial\\_groups](https://www.academia.edu/10097860/Behaviour_of_Brochothrix_thermosphacta_in_presence_of_other_meat_spoilage_microbial_groups). Acesso em: 22 março 2020.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

SÄDE, E. *Leuconostoc* spoilage of refrigerated, packaged foods. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. 2011. Disponível em: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/24357/leuconos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 23 maio 2020.

SÄDE, E.; LASSILA, E.; BJÖRKROTH, J. Lactic acid bacteria in dried vegetables and spices. **Food Microbiology**, v. 53, p. 110–114, 2016. DOI: 10.1016/j.fm.2015.09.005 Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0740002015001744> Acesso em: 19 setembro 2021.

SARAIVA, C. Influência do pH final e tipo de embalagem na conservação de carne

de bovino da raça maronesa - Parâmetros microbiológicos, físico-químicos, sensoriais e fração volátil. Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Veterinárias. 2008. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/277065016\\_Influencia\\_do\\_ph\\_final\\_e\\_tipo\\_de\\_embalagem\\_na\\_conservacao\\_de\\_carne\\_de\\_bovino\\_da\\_raca\\_maronesa\\_Parametros\\_microbiologicos\\_fisico-quimicos\\_sensoriais\\_e\\_fraccao\\_volatil](https://www.researchgate.net/publication/277065016_Influencia_do_ph_final_e_tipo_de_embalagem_na_conservacao_de_carne_de_bovino_da_raca_maronesa_Parametros_microbiologicos_fisico-quimicos_sensoriais_e_fraccao_volatil). Acesso em: 11 julho 2021.

SCHLINDWEIN, M. M.; KASSOUF, A. L. Análise da influência de alguns fatores socioeconômicos e demográficos no consumo domiciliar de carnes no Brasil.

**Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 44, n. 3, p.549-572, 2006. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/resr/a/zxBSL67LYx4zjHNW4jfMD7Q/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 21 abril 2020.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA, R. et al. Indicadores Como Ferramentas Para Análise De Aditivos Em Alimentos Industrializados. v. 5, p. 103–112, 2015. DOI: 10.7198/S2237-0722201500040016. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/287405022\\_INDICADORES\\_COMO\\_FERRAMENTAS\\_PARA\\_ANALISE\\_DE\\_ADITIVOS\\_EM\\_ALIMENTOS\\_INDUSTRIALIZADOS](https://www.researchgate.net/publication/287405022_INDICADORES_COMO_FERRAMENTAS_PARA_ANALISE_DE_ADITIVOS_EM_ALIMENTOS_INDUSTRIALIZADOS). Acesso em: 26 março 2020.

SILVA, R. X. A. et al. Lactato de sódio, nisina e sua combinação na validade comercial da linguiça Toscana embalada a vácuo e estocada a 4°C. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 4, p. 746–751, 2014. DOI: 10.1590/S0103-84782014000400029. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/cr/a/qMxKcDdTLc6gKxSk3kf4Grn/abstract/?lang=pt&format=html>. Acesso em: 26 março 2020.

SILVA, A. P. R. et al. Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, e18160159, 2018. DOI: 10.1590/1678-4324-2018160159. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/babt/a/zkmvyby6pB5kK9VHxVq6JRt/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 13 fevereiro 2022.

SILVA, J. L. DA et al. Behavior of spoilage bacteria and Salmonella enterica subspecies enterica O:4,5 in vacuum-packaged beef during refrigeration. **Ciencia Rural**, v. 50, n. 7, p. 1–7, 2020. DOI: 10.1590/0103-8478cr20200090. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/RPvYDBtr8tbXfCKQpmsKjTF/?lang=en>. Acesso em: 18 setembro 2021.

SLONGO, A. P. et al. Modeling the growth of lactic acid bacteria in sliced ham processed by high hydrostatic pressure. **LWT – Food Science Technology**, v. 42, n. 1, p. 303-306, 2009. DOI: doi.org/10.1016/j.lwt.2008.06.010. Disponível em:

<https://www-sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0023643808001515?via%3Dihub>. Acesso em: 29 março 2020.

SOUZA, M. L. R. DE et al. <b>Kaftas prepared with V-shaped filleting chips of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to smoking techniques. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 37, n. 2, p. 287, 2015. DOI: 10.4025/actascitechnol.v37i2.19576. Disponível em: [https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/19576/pdf\\_91](https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/19576/pdf_91). Acesso em: 30 outubro 2021.

VÉLEZ-PAÉZ, J. L. et al. Endocarditis bacteriana por *Staphylococcus hominis* de válvula nativa en paciente hospitalizado con COVID-19. Reporte de caso. **Acta Médica Peruana**, v. 37, n. 3, p. 336-340, 2020. DOI: 10.35663/amp.2020.373.1001. Disponível em: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v37n3/1728-5917-amp-37-03-336.pdf>. Acesso em: 26 janeiro 2022.

VENCATO, A. A. et al. Salt and crude plant extracts as preservatives in a meat model system (Ground pork shoulder). **Revista Caatinga**, v. 33, n. 2, p. 562–570, 2020. DOI: 10.1590/1983-21252020v33n229rc . Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rcaat/a/qbLmqpmFgMwwCWgprV9tnqs/?lang=en>. Acesso em: 29 agosto 2021.

VERMEIREN, L. et al. In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 1, p. 33–42, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02443.x Disponível em: <https://sfamjournals-onlinelibrary-wiley.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/epdf/10.1111/j.1365-2672.2004.02443.x> Acesso em: 19 setembro 2021.

WANG, W. et al. crossm *Staphylococcus hominis* BHG17 Isolated. n. 15, p. 16–17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01552-16>. Disponível em: <https://journals-asm-org.ez74.periodicos.capes.gov.br/doi/epub/10.1128/genomeA.01552-16>. Acesso em: 18 dezembro 2021.

WIESER, A. et al. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics – identification of microorganisms and beyond (mini review). **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 93, p. 965-974, 2012. DOI: 10.1007/s00253-011-3783-4. Disponível em: <https://link-springer-com.ez74.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007/s00253-011-3783-4.pdf>. Acesso em: 18 junho 2022.

ZHOU, B. et al. Novel species-specific targets for real-time PCR detection of four common pathogenic *Staphylococcus* spp. **Food Control**, v. 131, n. August 2021, p. 108478, 2022. DOI: [//doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108478](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108478). Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez74.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0956713521006162?via%3Dihub>. Acesso em: 18 dezembro 2021.

## APÊNDICES

### Identificação das Bactérias Ácido Láticas – 15 dias de fabricação

## Bruker MALDI Biotyper Identification Results



### Run Info:

Run Identifier: 210813-1236-1011021102  
 Comment:  
 Operator: Admin@FLEX-PC  
 Run Creation Date/Time: 2021-08-13T12:57:52.851  
 Number of Tests: 17  
 Type: Standard  
 BTS-QC: not present  
 BTS-QC Position:  
 Instrument ID: 8604674.03350  
 Server Version: 4.1.80 (PYTH) 102 2017-08-226\_04-55-52

### Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<a href="#">B1</a> (+++)(A)	A3 1 (Standard)	Leuconostoc citreum	<a href="#">2.28</a>	Leuconostoc citreum	<a href="#">2.12</a>
<a href="#">B2</a> (+)(C)	2 (Standard)	Leuconostoc citreum	<a href="#">1.99</a>	Leuconostoc citreum	<a href="#">1.89</a>
<a href="#">B3</a> (+++)(A)	3 (Standard)	Leuconostoc citreum	<a href="#">2.22</a>	Leuconostoc citreum	<a href="#">2.17</a>
<a href="#">B4</a> (+++)(C)	4 (Standard)	Leuconostoc citreum	<a href="#">2.07</a>	Leuconostoc citreum	<a href="#">1.93</a>
<a href="#">B5</a> (+++)(C)	5 (Standard)	Leuconostoc citreum	<a href="#">2.17</a>	Leuconostoc citreum	<a href="#">2.01</a>
<a href="#">B6</a> (+)(B)	B3 1 (Standard)	Leuconostoc citreum	<a href="#">1.98</a>	Leuconostoc citreum	<a href="#">1.90</a>
<a href="#">B7</a> (+++)(C)	2 (Standard)	Leuconostoc citreum	<a href="#">2.03</a>	Leuconostoc citreum	<a href="#">1.94</a>

Result overview table—continued on next page

Run Identifier: 210813-1238-101 1021102

Run Creation Date/Time: 2021-08-13T12:57:52.851

*Result overview table--continued from previous page*

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<a href="#">B8</a> (+++)(A)	3 (Standard)	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.13</a>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">1.96</a>
<a href="#">B9</a> (+++)(C)	4 (Standard)	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.19</a>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.09</a>
<a href="#">B10</a> (+++)(C)	5 (Standard)	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.19</a>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.11</a>
<a href="#">B11</a> (+++)(A)	C3 1 (Standard)	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.20</a>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.07</a>
<a href="#">B12</a> (+++)(C)	2 (Standard)	<i>Lactobacillus sakei</i>	<a href="#">2.32</a>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<a href="#">2.47</a>
<a href="#">C1</a> (+++)(A)	3 (Standard)	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.38</a>	<i>Leuconostoc citreum</i>	<a href="#">2.08</a>
<a href="#">C2</a> (+++)(C)	4 (Standard)	<i>Lactobacillus sakei</i>	<a href="#">2.44</a>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<a href="#">2.43</a>
<a href="#">C3</a> (+++)(C)	5 (Standard)	<i>Lactobacillus sakei</i>	<a href="#">2.43</a>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<a href="#">2.40</a>
<a href="#">C4</a> (-)(C)	B3 EXT TUBO 1 (Standard)	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.46</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.43</a>
<a href="#">C5</a> (-)(C)	B3 EXT TUBO2 (Standard)	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.39</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.31</a>

## Identificação das Bactérias Ácido Láticas – 90 dias de fabricação

### Bruker MALDI Biotyper Identification Results



#### Run Info:

Run Identifier: 211207-1338-1011021085  
 Comment:  
 Operator: Admin@FLEX-PC  
 Run Creation Date/Time: 2021-12-07T13:38:37.488  
 Number of Tests: 16  
 Type: Standard  
 BTS-QIC: not present  
 BTS-QIC Position:  
 Instrument ID: 8604674.03330  
 Server Version: 4.1.80 (PYTH) 102 2017-08-226\_04-55-52

#### Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<a href="#">D1</a> (+++)(A)	C25 -5 PLACA 1 COL BRANCA (Standard)	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.00</a>	Staphylococcus hominis	<a href="#">1.98</a>
<a href="#">D2</a> (+)(B)	C25 -5 PLACA 1 COL TRANSPARENTE (Standard)	Enterococcus demissus	<a href="#">1.92</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.63</a>
<a href="#">D3</a> (+++)(A)	C25 -5 PLACA 2 COL BRANCA (Standard)	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.00</a>	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.01</a>
<a href="#">D4</a> (+)(B)	C25 -5 PLACA 2 COL TRANSPARENTE (Standard)	Enterococcus demissus	<a href="#">1.84</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.63</a>

Result overview table—continued on next page

Run Identifier: 211207-1338-1011021085

Run Creation Date/Time: 2021-12-07T13:58:37.488

Result overview table—continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<a href="#">D5</a> (+++)(A)	C25 -4 PLACA1 COL BRANCA (Standard)	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.09</a>	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.09</a>
<a href="#">D6</a> (+++)(A)	C25 -4 PLACA 1 COL TRANSPAREN TE (Standard)	Enterococcus durissiei	<a href="#">2.00</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.68</a>
<a href="#">D7</a> (+++)(A)	C25 -4 PLACA 2 COL BRANCA (Standard)	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.10</a>	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.10</a>
<a href="#">D8</a> (+)(B)	C25 -4 PLACA 2 COL TRANSPAREN TE (Standard)	Enterococcus durissiei	<a href="#">1.91</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.63</a>
<a href="#">D9</a> (+++)(A)	C25 -3 PLACA 1 COL BRANCA (Standard)	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.04</a>	Staphylococcus hominis	<a href="#">1.97</a>
<a href="#">D10</a> (+)(B)	C25 -3 PLACA 1 COL TRANSPAREN TE (Standard)	Enterococcus durissiei	<a href="#">1.89</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.46</a>
<a href="#">D11</a> (+++)(A)	C25 -3 PLACA 2 COL BRANCA (Standard)	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.10</a>	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.09</a>
<a href="#">D12</a> (+)(B)	C25 -3 PLACA 2 COL TRANSPAREN TE (Standard)	Enterococcus durissiei	<a href="#">1.88</a>	No Organism Identification Possible	<a href="#">1.33</a>
<a href="#">E1</a> (+++)(A)	C25 -3 PLACA 1 COL BRANCA (Standard)	Staphylococcus hominis	<a href="#">2.03</a>	Staphylococcus hominis	<a href="#">1.99</a>

Result overview table—continued on next page