



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CENTRO DE CIÊNCIA E QUALIDADE DE ALIMENTOS**

MARIA STELLA DE AZEVEDO GONÇALVES

**EFEITO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURAIS NA INIBIÇÃO DE
Listeria monocytogenes EM LINGUIÇA CALABRESA COZIDA FATIADA E
REFRIGERADA**

CAMPINAS

2024

MARIA STELLA DE AZEVEDO GONÇALVES

**EFEITO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURAIS NA INIBIÇÃO DE
Listeria monocytogenes EM LINGUIÇA CALABRESA COZIDA FATIADA E
REFRIGERADA**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.*

Aluno: Maria Stella de Azevedo Gonçalves
Orientador: Prof.^a Dra. Beatriz Thie Iamanaka
Coorientadora: Dra. Renata Bromberg

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Maria Stella de Azevedo Gonçalves e orientada pela Prof.^a Dra. Beatriz Thie Iamanaka

**CAMPINAS
2024**

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha elaborada pela bibliotecária Vangri de Oliveira Camargo, CRB/8 6919

G635e Gonçalves. Maria Stella de Azevedo
Efeito de agentes antimicrobianos naturais na inibição de *Listeria monocytogenes* em linguiça calabresa cozida fatiada e refrigerada
/ Maria Stella de Azevedo Gonçalves. Campinas, 2024. 87 fls.

Orientador: Beatriz Thie Iamanaka
Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos - ITAL

1. L. Monocytogenes. 2. Teste de desafio. 3. Nitrito. 4. Extrato de aipo.
5 Vinagre. 6 Rótulo limpo. 7. Linguiça calabresa cozida
I. Iamanaka, Beatriz Thie II. Título

CDD 664.9

Título em inglês: EFFECT OF NATURAL ANTIMICROBIAL AGENTS ON THE INHIBITION OF *Listeria monocytogenes* IN SLICED AND REFRIGERATED COOKED SAUSAGE

Key-words: *L. monocytogenes*; challenge test; nitrite; celery juice; vinegar; clean label, calabrese sausage

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Dr^a. Beatriz Thie Iamanaka, Dr^a. Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos e Dr^a. Valéria Christina Amstalden Junqueira

Data da Defesa: 31 de Outubro de 2024

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Maria Stella de Azevedo Gonçalves, aprovada pela Comissão Julgadora em 31 de outubro de 2024.

Prof.(a) Dra. Prof.^a Dra. Beatriz Thie Iamanaka
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - CCQA (Presidente)

Prof.(a) Dra. Renata Bromberg
Centro de Tecnologia de Carnes – CTC (Coorientadora)

Dr.(a) Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos
Centro de Tecnologia de Carnes – CTC (Titular)

Dr.(a) Valéria Christina Amstalden Junqueira
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - CCQA (Titular)

Dr.(a) Josué José Silva
Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - CCQA (Suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao meu pai, Luiz, cuja constante apoio foram fundamentais em cada uma de minhas escolhas. Sua força e dedicação moldaram a pessoa e profissional que sou hoje.

Ao Nelson Rodrigues, agradeço pelo apoio incansável e por compartilhar comigo os momentos mais marcantes, tanto na vida pessoal quanto na profissional. Sua presença e suporte foram cruciais ao longo dessa trajetória.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Mestrado.

À equipe do Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos (CTC-ITAL), deixo meu reconhecimento pelo auxílio na produção das linguiças calabresas, essenciais para o desenvolvimento deste estudo.

Aos colaboradores do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA), expresso minha gratidão pelas contribuições, ensinamentos enriquecedores e pelas sugestões que foram de grande valor para este projeto.

Às empresas parceiras, meu sincero agradecimento pelo fornecimento dos aditivos utilizados nos testes in vitro e nas etapas de processamento deste estudo.

À minha orientadora, Beatriz Iamanaka, e à coorientadora, Renata Bromberg, expresso minha profunda gratidão pela orientação e pelo tempo dedicado, além do apoio contínuo e pelas contribuições fundamentais ao longo de todas as fases deste trabalho.

À Miriam Marquezini, meu reconhecimento pela importante colaboração e suporte no início deste projeto.

Meus agradecimentos a Ana Lucia e Márcia Mayumi, por todo o auxílio prestado, pela disposição em ajudar e generosidade em compartilhar conhecimentos, sempre dispostas a me ensinar.

À Glaucia Francelin, agradeço a parceria e pelos momentos compartilhados, que tornaram essa jornada mais leve e gratificante.

Por fim, agradeço à Ivonete e o Josué Silva pela sua constante disponibilidade e disposição em colaborar ao longo deste processo.

RESUMO

Produtos cárneos, como a linguiça calabresa fatiada, são amplamente consumidos, devido à sua praticidade e custo-benefício. Diante da crescente demanda por alimentos mais saudáveis, a indústria tem buscado substituir ingredientes sintéticos, como o nitrito, por alternativas de fontes naturais *clean label*, especialmente em produtos curados. Alguns vegetais, como aipo, beterraba e acelga, são naturalmente ricos em nitrato endógeno e tem sido alvo de estudos com resultados promissores na indústria. Este estudo avaliou o efeito de diferentes compostos antimicrobianos e suas combinações no crescimento de *L. monocytogenes* em linguiça calabresa cozida fatiada, armazenada a 4°C por 75 dias. Duas concentrações de inóculo foram testados, 2,0 e 4,0log e o comportamento do patógeno foi avaliado em dois processos distintos. O tratamento alternativo adicionado de extrato de aipo pré-convertido, acerola em pó e vinagre demonstrou ser eficaz de forma consistente em inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, em ambos os processos. Além disso, esse tratamento também inibiu o crescimento de bactérias lácticas, avaliadas em conjunto como um indicador de degradação. O estudo sugere que os aditivos antimicrobianos alternativos, combinados com condições físico-químicas, tais como pH próximo a 5,9 e atividade de água $\leq 0,956$, podem ser uma estratégia eficaz para controlar o crescimento de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, prolongando a vida útil e garantindo a segurança do alimento durante o armazenamento.

Palavras-chave:

L. monocytogenes; teste de desafio; nitrito; extrato de aipo; vinagre, rótulo limpo, linguiça calabresa cozida

ABSTRACT

Meat products, such as sliced calabrese sausage, are widely consumed due to their convenience and cost-effectiveness. In light of the growing demand for healthier foods, the industry has sought to replace synthetic ingredients, such as nitrites, with alternatives from natural, clean-label sources, especially in cured products. Some vegetables, such as celery, beetroot, and Swiss chard, are naturally rich in endogenous nitrate and have been the focus of studies with promising results in the industry. This study evaluated the effect of different antimicrobial compounds and their combinations on the growth of *L. monocytogenes* in cooked, sliced calabrese sausage stored at 4°C for 75 days. Two inoculum concentrations were tested, 2.0 and 4.0 log, and the pathogen behavior was assessed in two distinct processes. The alternative treatment, consisting of pre-converted celery extract, acerola powder, and vinegar, consistently demonstrated effectiveness in inhibiting the growth of *L. monocytogenes* in both processes. Furthermore, this treatment also inhibited the growth of lactic acid bacteria, which were evaluated together as an indicator of degradation. The study suggests that alternative antimicrobial additives, combined with physicochemical conditions such as a pH near 5.9 and water activity <0.956, can be an effective strategy for controlling the growth of *L. monocytogenes* in meat products, extending shelf life and ensuring food safety during storage.

Keywords: *L. monocytogenes*; challenge test; nitrite; celery juice; vinegar; clean label, Calabrese sausage

SUMÁRIO

1.	<i>Introdução</i>	9
2.	<i>Objetivos</i>	11
2.1.	Objetivos específicos	11
3.	<i>Revisão bibliográfica</i>	11
3.1.	Produtos cárneos: linguiça calabresa cozida	11
3.2.	<i>L. Monocytogenes</i>	13
3.3.	Nitritos, nitratos e substitutos.....	19
3.4.	Lactato de sódio e combinações.....	22
3.5.	Vinagre.....	24
3.6.	Extrato de acerola.....	25
4.	<i>Material e métodos</i>	27
4.1.	Cepas de <i>L. monocytogenes</i> provenientes de produtos cárneos e ambiente.	27
4.1.1	isolamento.....	27
4.1.2	caracterização fenotípica dos isolados	28
4.1.2.1.	Teste de catalase.....	28
4.1.2.2.	Coloração de gram.....	28
4.1.2.3.	Teste de fermentação de xilose e ramnose	28
4.1.2.4.	Teste de verificação de beta hemólise.....	28
4.1.2.5.	Teste de verificação de motilidade.....	29
4.1.2.	Caracterização genotípica dos isolados.....	29
4.1.2.1.	Extração e verificação da integridade do dna	29
4.1.2.2.	Amplificação via pcr e sequenciamento	30
4.1.3.	Culturas e condições de cultivo.....	31
4.2.	Triagem in vitro dos compostos antimicrobianos alternativos naturais e tradicionais para o processamento da linguiça calabresa	31
4.3.	Processamento do lote experimental da linguiça calabresa cozida	37
4.3.1.	Matérias-primas e ingredientes	37
4.3.2.	Processamento do lote experimental das amostras.....	37
4.3.3.	Caracterização das amostras.....	40
4.4.	Teste de desafio.....	40
4.4.1.	Preparo do pool de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	41
4.4.2.	Preparo das amostras de linguiça para o teste de desafio	41
4.4.3.	Contaminação experimental das amostras	42
4.4.4.	Avaliação da inibição do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em amostras de linguiça calabresa cozida adicionadas de ingredientes antimicrobianos sintéticos e alternativos.	43
4.5.	Análise estatística.....	44

5. Resultados e discussão.....	44
5.1. Detecção e identificação das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	44
5.2. Avaliação da eficiência antimicrobiana in vitro	46
5.3. Impacto do cozimento nas características físico-químicas da linguiça calabresa cozida.....	52
5.4. Monitoramento do pH e atividade de água durante 75 dias de armazenamento das linguiças fatiadas.....	56
5.5. Monitoramento dos teores de nitrito e nitrato das amostras de linguiça calabresa cozida e fatiada durante o armazenamento refrigerado.....	59
5.6. Crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em linguiça calabresa cozida adicionada de diferentes antimicrobianos.....	62
6. Conclusões.....	71
7. Referências.....	72

1. INTRODUÇÃO

No setor de *food service*, a eficiência operacional é essencial, recentes dados de mercado apontam um crescimento contínuo (ABIA, 2023). Restaurantes, lanchonetes e outros estabelecimentos alimentícios estão em busca constante de soluções que otimizem tempo e custos, uma vez que essas melhorias são fundamentais para a competitividade no mercado. O consumo de produtos cárneos, incluindo embutidos, é amplamente difundido em todo o mundo, sendo uma categoria importante de alimentos (Bernardo et al. 2020). Nesse contexto, o uso de produtos como linguiça calabresa já fatiada e embalada se destaca como uma opção vantajosa, pois alia praticidade e economia.

No Brasil, a linguiça calabresa, feita exclusivamente com carne suína, curada e com pimenta calabresa, destaca-se como um dos embutidos de maior consumo (Brasil, 2000). No entanto, a segurança microbiológica desses produtos é uma preocupação significativa, devido ao risco de recontaminação nas etapas posteriores do processamento, distribuição e comercialização. Isso se deve à possibilidade de contaminação cruzada com outros alimentos e manipulação inadequada durante o fatiamento e embalagem do produto (Matle, et al. 2020; Currie, et al. 2015).

As possíveis contaminações com patógenos, tais como a *Listeria monocytogenes* representam um risco significativo para a saúde pública, uma vez que esta bactéria pode causar infecções graves com alta taxa de mortalidade em idosos, mulheres grávidas, neonatos e populações imunocomprometidas (Ryser, 2021). *L. monocytogenes* tem a capacidade de sobreviver e proliferar em ambientes industriais de alimentos, incluindo utensílios, superfícies e ralos, além de apresentar resistência a uma variedade de tratamentos antimicrobianos e capacidade de crescimento em condições de refrigeração (Osek, Lachtara, e Wieczorek ,2022; Olivo, 2018; Ichiro Sakate et al., 2003; De Curtis, Franceschi e De Castro, 2002). As características dos produtos cárneos prontos para consumo, tais como teor de umidade, pH e composição nutricional, também criam condições favoráveis para a

proliferação deste microrganismo (Gomides e Ribeiro, 2021; Duarte, 2011; Feitosa, 1999).

Para diminuir os riscos de contaminação com *L. monocytogenes* e outros patógenos, uma abordagem comum envolve a combinação de nitrito de sódio com outros agentes antimicrobianos, como lactato de sódio, diacetato de sódio (Glass et al. 2002), cloreto de sódio, benzoato de sódio (Pereira et al. 2013). Essas combinações não apenas inibem o crescimento bacteriano, mas também conferem características sensoriais ao produto (Barancelli et al. 2020).

Os consumidores estão cada vez mais atentos às informações sobre os produtos e aos ingredientes presentes nos alimentos que consomem, e estão preocupados com a saúde e a segurança alimentar. Isso tem aumentado a procura por alimentos com ingredientes naturais que não contenham aditivos sintéticos, como conservantes. Vegetais como beterraba, sementes de uva, castanhas, polpa de tomate, alho-poró, aipo e espinafre são fontes naturais ricos em nitratos e podem ser usados como substitutos (Pietrobon e Trindade Alfaro, 2023; Cherobin, 2023). Nesse contexto, é fundamental avaliar a eficácia e adotar estratégias de intervenção que atendam aos critérios de rotulagem limpa, natural ou orgânica para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em produtos RTE visando reduzir o risco de doenças transmitidas por alimentos (McDonnell, Glass e Sindelar, 2013; Kruger, 2006).

O teste de desafio é uma ferramenta fundamental para validação da segurança microbiológica, sendo fundamental para determinar o potencial de crescimento de *L. monocytogenes* em alimentos refrigerados prontos para consumo, como é o caso da linguiça calabresa fatiada, mais especificamente, para determinar se um alimento RTE pode ou não suportar o crescimento desse patógeno. Estes procedimentos simulam condições reais, permitindo a avaliação da capacidade das intervenções em controlar o crescimento microbiano, com o objetivo de garantir a segurança e qualidade dos produtos finais. Além de avaliar a segurança de um produto em termos de crescimento de *L. monocytogenes*, teste de desafio pode ser utilizados para validar um tratamento ou processo que visa reduzir ou eliminar a presença do patógeno (Health Canada, 2012).

2. OBJETIVOS

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a segurança microbiológica da linguiça calabresa cozida, fatiada e refrigerada, elaborada com agentes antimicrobianos alternativos naturais, para avaliar se são capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em comparação com ingredientes sintéticos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar *L. monocytogenes* de produtos cárneos e planta processadora de carnes, a serem testadas quanto a sua resistência aos agentes antimicrobianos avaliados.
- Investigar, por meio de teste *in vitro*, o potencial listeriostático de aditivos naturais e artificiais como agentes antimicrobianos.
- Avaliar a eficácia dos compostos antimicrobianos em inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em concentrações de 2 log UFC/g e 4 log UFC/g.
- Avaliar a eficácia dos agentes antimicrobianos alternativos naturais na linguiça calabresa cozida e fatiada na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* durante o armazenamento refrigerado.
- Caracterizar as linguiças por meio de análises físico-químicas e microbiológicas, comparando-as em relação aos aditivos naturais e sintéticos testados.
- Avaliar a estabilidade microbiológica da linguiça com aditivos alternativos naturais e artificiais incluindo a contagem de bactérias lácticas, como indicador de deterioração, durante o armazenamento refrigerado

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. PRODUTOS CÁRNEOS: LINGUIÇA CALABRESA COZIDA

Produtos de origem animal são considerados os mais perecíveis dentre os diversos grupos de alimentos por possuírem características intrínsecas propícias

ao desenvolvimento de microrganismos, como a elevada atividade de água e altos teores de nutrientes (Delgado-Pando et al. 2021; Duarte, 2011).

A linguiça calabresa é um produto obtido exclusivamente de carnes suína, curado e adicionado de ingredientes, devendo ter o sabor picante característico da pimenta calabresa. Este produto pode ser submetido ou não ao processo de estufagem ou similar para desidratação e/ou cozimento, sendo o processo de defumação opcional (Brasil, 2000).

O tratamento térmico é uma etapa crucial na produção de linguiça calabresa, pois visa desativar enzimas e microrganismos patogênicos e aquelas sensíveis a temperaturas elevadas, sem comprometer o valor nutricional e características sensoriais. Durante essa etapa, as populações bacterianas presentes na carne são reduzidas, permanecendo algumas bactérias como enterococos e lactobacilos, além de esporos (Furtado, 2021; Estelles 2003; Roça, 2000).

Após o tratamento térmico, etapas subsequentes de processamento, das linguiças calabresas cozidas fatiadas incluem o descascamento, fatiamento e embalagem, podendo resultar na recontaminação por microrganismos psicotróficos presentes nos equipamentos, ambiente ou manipuladores (Pothakos et al. 2015; Labadie, 1999; Nychas, Drosinos, e Board, 1998).

No caso específico da linguiça calabresa, que é um embutido feito a partir de carne suína e condimentos, a contaminação por *L. monocytogenes* pode ocorrer em diferentes etapas da produção e distribuição, como no abate dos animais, no processamento da carne, na adição dos temperos, no processo de embalagem e no transporte (Matle, et al. 2020; Currie, et al. 2015). Além disso, a recontaminação da linguiça calabresa por *L. monocytogenes* também pode ocorrer durante o armazenamento em temperaturas inadequadas ou pela manipulação por mãos ou superfícies contaminadas (Silva et al. 2017; Schaffner, 2018).

Devido à possibilidade de contaminações após o tratamento térmico e à sobrevivência de microrganismos, aditivos são amplamente utilizados para preservar a qualidade dos produtos alimentícios. Eles representam uma medida adicional de segurança para prevenir o crescimento de microrganismos indesejados durante sua vida útil, mantendo a integridade ao longo do tempo e

contribuindo para conservação, além de atender características tecnológicas e sensoriais desejadas (Furtado, 2021, Nassu, 2021).

Esses aditivos podem ser classificados em duas categorias principais: alternativos e sintéticos. Aditivos alternativos são obtidos a partir de fontes naturais, como extratos de plantas ou substâncias produzidas por microrganismos, incluindo bacteriocinas e enzimas. Por outro lado, os aditivos sintéticos são substâncias fabricadas industrialmente que se assemelham a componentes naturais, seja por terem moléculas semelhantes às encontradas em organismos vivos ou por serem moléculas criadas em laboratório com propriedades técnicas distintas (Agrimidia, 2021). Ingredientes sintéticos oferecem funcionalidades importantes para a qualidade da carne, tornando ainda mais difícil o desafio de encontrar alternativas (Delgado-Pando et al. 2021).

Aditivos são amplamente regulados e/ou fiscalizados por agências de segurança alimentar, como a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), na União Europeia (UE) e a Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos. No Brasil, a regulamentação e controle dos aditivos alimentares são de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece uma lista de aditivos permitidos, juntamente com os níveis máximos de utilização, que variam de acordo com o tipo de produto. No caso de produtos à base de carne, a lista inclui antimicrobianos, antioxidantes, texturizantes, corantes, estabilizadores e reguladores de acidez.

Apesar de algumas preocupações dos consumidores sobre a segurança dos aditivos devido à sua denominação química, é importante ressaltar que todos os aditivos utilizados na elaboração de produtos cárneos são considerados seguros dentro dos limites estabelecidos pelas autoridades de segurança alimentar, como a ANVISA.

3.2. *L. monocytogenes*

Apesar dos avanços nas técnicas empregadas para garantir a qualidade e a inocuidade de alimentos, doenças transmitidas por alimentos (DTA) continuam sendo um grave problema de saúde pública (WHO, 2022; Jay, 2005). A Organização Mundial de Saúde (OMS) relatou em 2021, cerca de um em cada dez indivíduos em todo o mundo pode contrair doenças de origem alimentar a cada ano,

resultando em até 420.000 óbitos, com um terço desses casos ocorrendo em crianças com idade inferior a cinco anos. O aumento nos casos relatados, tem levado entidades governamentais, indústrias e os próprios consumidores a se tornarem mais exigentes em relação à segurança sanitária dos alimentos (Gallo, 2020; WHO, 2022).

L. monocytogenes, classificada como o terceiro patógeno zoonótico mais prejudicial, é um agente significativo causador da listeriose em animais e humanos, associada ao consumo de produtos alimentícios contaminados (Ravindhiran, 2023). É uma bactéria psicrotrófica, Gram positiva e não esporogênica, frequentemente encontrada na natureza e no ambiente de produção de alimentos (Heir et al. 2018). É um microrganismo que se destaca, dada sua capacidade de sobreviver e proliferar em condições adversas, como temperaturas de refrigeração e baixa atividade de água (Mena et al. 2004). Sua resistência fisiológica torna difícil seu controle, especialmente em alimentos não submetidos a tratamento térmico. Além disso, a contaminação cruzada, a cocção inadequada e a sobrevivência após o processamento aumentam o risco de listeriose (Matle, Mbatha, e Madoroba, 2020; Currie, et al. 2015; Lianou e Sofos, 2007).

As cepas de *L. monocytogenes* podem se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura, entre -0,4°C e 45°C, com um intervalo ótimo entre 30°C e 37°C, sendo capaz de suportar inúmeros ciclos de congelamento e descongelamento; e crescem na faixa de pH 4,4 a 9,6, com um pH ótimo entre 6,0 e 7,5. Condições ácidas em muitos casos podem inibir seu crescimento. Entretanto, certas linhagens demonstram uma notável capacidade de sobrevivência em ambientes ácidos (Silva Filho, 2018), devido sua variabilidade, devido a habilidade de resistir a uma variedade de condições ambientais. Isso inclui sua capacidade de persistir em diferentes superfícies, enfrentar temperaturas extremas, como congelamento e cozimento e, até mesmo prosperar em condições aeróbias facultativas (Camargo et al. 2017) (Tabela 1).

Tabela 1. Fatores intrínsecos e extrínsecos relevantes para a sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes*.

Fatores	Valores		
	Mínimo	Ótimo	Máximo
Temperatura (°C)	-0,4	37	45
pH	4,0	7,0	9,6
Atividade de água	0,92	≥ 0,97	>0,99
Concentração de sal (%)	<0,5	0,7	16

A ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* pode causar desde uma forma autolimitada de gastroenterite até complicações graves em grupos de risco, como dos idosos, imunocomprometidos, gestantes e neonatos (Brito, 2021). Em casos graves, a listeriose pode evoluir para septicemia e meningite bacteriana, sendo especialmente perigosa para mulheres grávidas, podendo levar ao aborto ou à morte fetal (Silva et al. 2021). Acredita-se que a mortalidade da forma mais severa de listeriose seja de 15 a 30%, sendo está uma das principais causas de óbito ocasionadas por doenças de origem alimentar (Silva et al. 2017), com significativo impacto econômico na sociedade e indústria alimentícia (Heir et al. 2018), como indenizações e *recalls*.

Segundo um estudo realizado pela *Food Marketing Institute and the Grocery Manufacturers Association* (GMA) nos Estados Unidos (EUA), *recalls* de alimentos equivalem a um prejuízo médio de 10 milhões de dólares para as indústrias alimentícias. O estudo ressalta que, além do número de *recalls* de alimentos ter aumentado significativamente nos EUA e Reino Unido entre os anos 2015 e 2016, a principal causa foi a contaminação biológica (microrganismos e toxinas). Relata-se que, no período estudado, 65% dos casos de *recalls* por esse motivo nos EUA foram pela presença de *L. monocytogenes* (Wood, 2017).

Diversos alimentos já foram associados à transmissão de *L. monocytogenes*, como leite cru ou inadequadamente pasteurizado, sorvetes, queijos, frutos do mar e produtos cárneos como linguças cruas fermentadas, salsichas tipo *hot dog* (Silva et al. 2017), presunto suíno cozido (Fai et al. 2011), picanha bovina, fraldinha e filé de peito de frango (Proteste, 2017).

A normativa oficial para controle da *L. monocytogenes* foi estabelecida por meio da Instrução Normativa SDA/MAPA nº 9, de 8 de abril de 2009 (Brasil, 2009).

Essa regulamentação tem como propósito avaliar a presença desse patógeno em produtos de origem animal prontos para consumo ("ready to eat"/RTE que apresentem as seguintes características físico-químicas: pH > 4.4 (superior a quatro ponto quatro) ou Atividade de Água > 0.92 (superior a zero ponto noventa e dois) ou concentração de cloreto de sódio < 10 % (inferior a dez por cento), respeitadas as características de seus processos de produção.

Em 2018, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proibiu a distribuição e comercialização de um lote de peito de frango de marca nacional e lotes de vegetais congelados importados da Europa devido à contaminação por *L. monocytogenes* (Brasil, 2022a, Brasil, 2022b). A investigação do surto envolveu a ANVISA, o MAPA e as secretarias de saúde dos estados afetados. A empresa responsável pelo produto realizou um recolhimento/*recall* voluntário dos lotes contaminados e adotou medidas para garantir a qualidade e a segurança dos alimentos.

No período de janeiro a dezembro de 2019, o MAPA realizou um levantamento no qual foi identificada a presença de *L. monocytogenes* em 0,96% das 1.035 amostras analisadas, pertencentes a diversas categorias de alimentos. A análise abrangeu produtos cárneos e de pesca, como linguiça cozida, linguiça defumada, presunto defumado, camarão cozido, peixe cozido, entre outros além de produtos lácteos, como queijos azul, burrata, coalho, cottage, colonial, cremoso, queijo dinamarquês semimacio, e de Manteiga. Nas amostras de produtos cárneos, o patógeno foi detectado em duas amostras de Presunto Cozido, uma de Salame, uma de Linguiça Cozida e uma Jerked Beef (Brasil, 2020).

Ao compilar dados de estudos publicados entre 2011 e 2022, abordando a presença de *L. monocytogenes* em amostras de carne e seus derivados, foram levantadas 610 amostras de diversas regiões do Brasil, incluindo produtos cárneos íntegros (Ristori et al. 2014), produtos cárneos fatiados (Webber, 2023), carcaças (Iglesias et al. 2017), carne crua (Soares et al. 2021), entre outras categorias de alimentos (Ramires et al. 2021; Teixeira et al. 2020; Rodrigues et al. 2018; Fai et al. 2011). A média de incidência entre os estudos variou, atingindo 22,21%, evidenciando a presença recorrente da *L. monocytogenes*.

Em Portugal, uma pesquisa revelou a presença de *L. monocytogenes* em diversos produtos, com alimentos crus apresentando as maiores taxas de não

conformidade, sendo 60% de amostras de frango cru, 18,5% de farinha, 17,7% de carne vermelha crua, 16,7% de leite cru, 12,9% de legumes congelados e 12% de peixe cru. A presença de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo foi considerado alarmante, visto que produtos crus são normalmente cozidos ou pasteurizados antes do consumo (Mena et al. 2004).

No ano de 2018, a África do Sul teve o maior surto de listeriose já registrado, com 948 casos de listeriose confirmados e 180 mortes desde o início do ano de 2017. A taxa de letalidade registrada foi de 27%. Das 109 pessoas entrevistadas com listeriose confirmada, 85% relataram ter consumido produtos cárneos prontos para o consumo. O produto *poland sausage*, uma linguiça defumada mista, foi o item alimentar mais relatado (Motsoaledi, 2018).

No Brasil, não foram oficialmente relatados surtos de listeriose humana associados a alimentos, o que contribui para a ausência de dados que evidenciam a magnitude do problema (Barancelli, 2020). No entanto, embora *L. monocytogenes* esteja comprovadamente presente em diversos produtos, a falta de obrigatoriedade de notificação dos casos no país, juntamente com a dificuldade de isolar *L. monocytogenes* e sua associação com alimentos contaminados, contribuem para a subnotificação da doença (Rodrigues, Sá e Melo, 2016; Barancelli, 2020). Isso destaca a importância de se identificar as fontes de infecção e os alimentos potencialmente envolvidos.

A Resolução-RDC nº 724/22 e sua Instrução Normativa-IN nº 161/22 estabelecem os padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano. Em relação à *L. monocytogenes*, essas normativas estabelecem critérios específicos para dois tipos de alimentos: aqueles prontos para o consumo e os destinados às lactantes.

Para os alimentos prontos para o consumo, o limite microbiológico permitido é de 10^2 UFC/g unidades em cinco amostras. Além disso, para produtos prontos para o consumo destinados a lactantes ou a fins especiais, a normativa exige a ausência de *L. monocytogenes* em 10 amostras, o que significa que qualquer detecção do microrganismo, mesmo que em concentração mínima, é considerada inaceitável nesses alimentos, devido ao potencial risco que apresentam para grupos de maior vulnerabilidade (Brasil, 2022a, b).

Estão isentos da necessidade de monitoramento regular os alimentos que atendem a pelo menos uma das seguintes condições: prazo de validade inferior a 5 dias, pH menor ou igual a 4,4, atividade de água menor ou igual a 0,92, ou pH menor ou igual a 5,0 e atividade de água menor ou igual a 0,94. A presença do microrganismo em concentrações superiores a esse limite pode representar um risco à segurança alimentar (Brasil, 2022a, b).

L. monocytogenes tem sido frequentemente associada à indústria de produtos cárneos prontos para o consumo, como mencionado anteriormente. Essa bactéria apresenta uma notável capacidade de formar biofilmes, conforme apontado por estudos (Zhang et al. 2021; Gehlen, 2016; Valderrama; Cutter, 2013; MOLTZ, 2005). Equipamentos e superfícies de contato são considerados as principais fontes de recontaminação desses produtos devidos a essa habilidade. Esses biofilmes podem aumentar a sobrevivência da bactéria em ambientes adversos, tornando-a mais resistente aos procedimentos de higienização (Magalhães et al. 2014). Biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos que se aderem a uma superfície e produzem uma matriz extracelular na qual estes microrganismos estão incorporados (Bremer, Monk e Osborne, 2001; Zhang et al. 2021). Apesar da dose infectante de *L. monocytogenes* ser desconhecida (Silva et al. 2021), em geral os alimentos apresentam baixos níveis de contaminação (menos de 100 UFC – Unidades Formadoras de Colônia por grama) (Auvolat, Besse, 2016), o que dificulta seu isolamento, detecção e, principalmente, quantificação, podendo levar a resultados falsos negativos. Além disso, a coexistência e interações entre *L. monocytogenes* e outras bactérias que habitam o mesmo nicho podem inibir seu crescimento, tais como as bactérias lácticas (Teixeira et al. 2018; Cornu et al. 2011; Mellefont, Ross, 2007; Devlieghere et al. 2001), e outras espécies do gênero *Listeria spp.* (Auvolat, Besse, 2016; Heir et al. 2018).

A ocorrência de microrganismos patogênicos e deteriorantes é um sério problema de segurança e qualidade microbiológica para a cadeia de produção de alimentos (WHO, 2022). Assim, análises microbiológicas são de grande valia para garantir a inocuidade e avaliar riscos de infecção (Gandra et al. 2008).

Embora a identificação e quantificação microbiana sejam importantes para acessar o potencial de crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes

na cadeia de produção de alimentos, tais análises não são suficientes para um entendimento das relações específicas entre o alimento, como um nicho ecológico, e sua microbiota (Cauchie et al. 2017).

Desta forma, o conhecimento dos parâmetros intrínsecos e extrínsecos de produtos cárneos pode propiciar o uso de abordagens combinadas para melhor conservação. Entre estas podemos citar a atividade de água, a qual possui uma faixa limitante no crescimento de alguns microrganismos e a adição de sais de sódio ou potássio, como por exemplo, o nitrito e nitrato, que atuam na inibição da germinação dos esporos de bactérias do gênero *Clostridium*. Há relatos que indicam que estes compostos também podem inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e nos aspectos sensoriais dos produtos cárneos curados (Christieans et al. 2018; McClure, Kelly, Roberts, 1991).

3.3. NITRITOS, NITRATOS E SUBSTITUTOS

Nitritos sintéticos, como nitrito de sódio e nitrito de potássio, são amplamente utilizados pelas indústrias de alimentos, devido à sua estabilidade, uniformidade e baixo custo (Devèze, 2021). No entanto, apesar do baixo custo e facilidade de uso, as preocupações dos consumidores sobre os aditivos sintéticos têm aumentado devido aos riscos para a saúde humana e, têm impulsionado a preferência por alimentos naturais e orgânicos (Awad, et al. 2022; Delgado-Pando et al. 2021; Sebranek, Bacus, 2007).

O processo de cura em produtos cárneos, que envolve a adição de nitrito, desempenha um papel fundamental na obtenção de características desejadas, como sabor, cor e textura (Devèze, 2021; Hui, 2012; Pegg, Shahidi, 2000). No entanto, a formação de substâncias potencialmente prejudiciais, como as N-nitrosaminas, durante o processo de cura gera preocupações devido ao potencial carcinogênico. A formação dessas substâncias é influenciada por diversos fatores, tais como temperatura e tempo de cocção, além do teor de gordura e proteína nos produtos cárneos (Zhou, Wang, Wang, 2020).

A interação entre as bactérias e o nitrito em produtos cárneos pode ser complexa e variar dependendo do tipo de bactéria presente, das condições ambientais e do processamento do alimento (Devèze, 2021; Sindelar, Milkowski,

2012). Portanto, é crucial que a indústria de alimentos monitore cuidadosamente a qualidade microbiológica de seus produtos, enquanto os consumidores devem seguir as orientações de armazenamento e preparo (ADMIN, 2024; Pegg, Shahidi, 2000).

Estudos realizados concluíram que 5% da ingestão média de nitritos e de nitratos provêm do consumo de produtos cárneos curados (WHO, 2010; Pennington, 1998). O comitê de peritos em aditivos alimentos do *Food and Agriculture and Organization/World Health Organization* (FAO/WHO) preconiza limites de Ingestão Diária Aceitável (IDA) entre 0-0,07mg/kg de peso corpóreo para íons nitrito (WHO, 2003), e entre 0-3,7 mg/kg de peso corpóreo para íons de nitrato (WHO, 1996). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza para produtos cárneos industrializados cozidos o limite máximo residual de 150 mg/kg de nitrito, 300 mg/kg de nitrato e a soma dos nitritos e nitratos, expressa como nitrito de sódio, não deve superar 150 mg/kg (Brasil, 2019). Essa medida visa garantir a segurança alimentar e reduzir os possíveis riscos para a saúde pública.

Como alternativa ao nitrito sintético, as indústrias de ingredientes e de produtos cárneos curados buscam uma alternativa viável, que mantenha os atributos sensoriais e garanta a segurança microbiológica do produto (Flores, Toldrá, 2021; Krause, 2011; Bacus, 2006). Extratos naturais são considerados uma opção promissora, pois mantêm as características dos produtos cárneos curados, como cor e sabor, especialmente em produtos com alto teor de gordura e prontos para consumo, enquanto oferecem proteção contra alterações oxidativas e microrganismos (Awad et al. 2022). Além disso, conferem concentrações residuais de nitritos mais reduzidas, embora variáveis do que os produtos curados convencionais (Sindelar et al. 2007).

Alguns vegetais, como aipo, beterraba e acelga, são naturalmente ricos em nitrato endógeno, apresentando teores elevados de nitrato, variando de 1.500 a 2.800 ppm (Sebranek, Bacus, 2007). Além disso, esses vegetais são ricos em antioxidantes, como vitamina C e compostos fenólicos, os quais podem auxiliar na decomposição do nitrito em óxido nítrico, evitando assim a formação de nitrosaminas (Awad et al. 2022; Zhou, Wang, Wang, 2020; Kim et al. 2019; Riel et al. 2017; Correia et al. 2010). No entanto, de acordo com a literatura ainda não

existe um substituto único para o nitrito que possa fornecer simultaneamente todas as funções do nitrito convencionalmente usado (Alahakoon et al. 2015).

O uso desses extratos alinha-se com as preferências dos consumidores que buscam opções de alimentos mais seguras e livres de aditivos químicos, promovendo uma abordagem mais sustentável na produção de produtos cárneos (Flores, Toldrá, 2021; Horsch et al. 2013; Krause, 2011; Sebranek et al. 2012; Xi et al. 2012).

O extrato de aipo em pó pré-convertido é amplamente empregado como fonte de nitrito vegetal no processamento de carne natural ou orgânica, em razão de seu sabor sutil e do mínimo efeito de cor que exerce sobre os produtos finais. É facilmente obtido e reconhecido não apenas por sua função como fonte de nitrato, mas também por seu potencial como antioxidante natural. Sua aplicação como antioxidante representa uma alternativa mais saudável quando comparada a aditivos sintéticos, reduzindo potencialmente riscos à saúde (Awad, et al. 2022; Oliveira, 2015).

A utilização do extrato de aipo em produtos cárneos processados é permitida em diversos países, o Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, define regras para a utilização de aditivos alimentares na União Europeia. O regulamento permite o uso de extrato de aipo como fonte natural de nitrato/nitrito em produtos cárneos, desde que estejam em conformidade com as quantidades máximas estabelecidas. Já nos Estados Unidos, a Food and Drug Administration (FDA) permite o uso de extrato de aipo como fonte de nitrato/nitrito em produtos cárneos, conforme especificado no Código de Regulamentos Federais (21 CFR 172.410). No entanto, a FDA exige que os fabricantes rotulem corretamente os produtos que contêm extrato de aipo como agente de cura e forneçam informações sobre a quantidade de nitrato/nitrito presente nos produtos (FSIS, 2023). Além de ser uma opção natural e saudável para substituir o nitrito de sódio, estudos já demonstraram que o uso do extrato de aipo também apresenta propriedades antioxidantes e antimicrobianas, contribuindo para a qualidade e segurança (Chen, 2023; da Silva, 2021; Benedicti, 2014; Sipailiene et al. 2003; Singh, Singh, Maurya, 2002).

No entanto, produtos curados com ingredientes naturais e concentrações reduzidas de nitrito podem apresentar maior suscetibilidade ao crescimento de

patógenos, a menos que sejam adicionados antimicrobianos adjuvantes. Essa redução na atividade antimicrobiana é especialmente preocupante quando se busca o controle de *L. monocytogenes* em produtos prontos para consumo à base de carne e aves refrigeradas (Golden et al. 2014).

3.4. LACTATO DE SÓDIO E COMBINAÇÕES

O lactato de sódio é um composto muito utilizado em produtos cárneos processados, pois desempenha diversas funções, desde inibir o crescimento de determinados microrganismos durante o armazenamento, e também proporciona um sabor suave em comparação com o cloreto de sódio, melhorando o sabor da carne. Ele também contribui para a capacidade de retenção de água e atua como agente umectante, o que resulta em maior rendimento de cozimento e aumento da vida útil dos produtos, além de possibilitar a redução de sódio, sem afetar significativamente a textura ou o sabor dos alimentos (Sallam, Samejima, 2004; Hartmann, Silva, 2011; Glass et al. 2002).

Além disso, auxilia no controle de bactérias patogênicas, como *E. coli*, *Listeria*, *Clostridium* e *Salmonella*, e outros microrganismos que podem ocasionar a deterioração dos alimentos, aumentando a segurança intrínseca dos alimentos (Hartmann, Silva, 2011; Iocca, 2009). Em produtos cárneos processados o lactato, é utilizado, pois, esses alimentos são particularmente suscetíveis à contaminação microbiana devido seu teor elevado de umidade e atividade de água (Pereira, 2012).

A ação antimicrobiana do lactato de sódio é fundamentada na redução do pH intracelular dos microrganismos. Essa propriedade decorre da notável capacidade dos ácidos orgânicos em atravessar a membrana citoplasmática, resultando numa disparidade de pH entre o ambiente externo e o interior celular. A redução da atividade de água no alimento também é uma possível causa do efeito antimicrobiano do lactato, prolongando a fase lag de crescimento microbiano e diminuindo a taxa de multiplicação dos microrganismos (O'Grady, Kerry, 2010).

Nos Estados Unidos, a FDA (2000) permite o uso de até 4,8% de lactato de sódio como agente antimicrobiano no peso final do produto. Em 2012 esse valor

foi questionado, uma vez que relataram que concentrações acima de 3,0% podem afetar as propriedades organolépticas dos produtos (Perumalla et al. 2012).

No Brasil, o lactato de sódio é um aditivo alimentar autorizado para o uso em carnes e produtos cárneos, seu limite máximo de uso é de 3,5 g/100 g, sendo ele classificado como agente regulador de acidez (Brasil, 2019). É importante notar que, embora esse composto seja geralmente considerado seguro para consumo humano, o consumo excessivo pode ocasionar efeitos colaterais, como diarreia e náusea. Por isso, é importante seguir as orientações de uso recomendadas e manter os níveis de consumo dentro dos limites considerados seguros (Hartmann, Silva, 2011).

Estudo citam algumas vantagens da aplicação do lactato de sódio em produtos cárneos e derivados, o qual proporciona uma prolongação da vida útil, podendo acentuar o aroma e sabor dos produtos, garante um aumento da segurança microbiológica, além de auxiliar na conservação dele (Hartmann, Silva, 2011). Diversos estudos têm investigado os efeitos do lactato de sódio e do lactato de potássio sobre *L. monocytogenes*.

A inibição do crescimento de *L. monocytogenes* em carnes em função do uso de lactato de sódio de forma isolada ou combinada com o diacetato de sódio já foi constatada (Mbandi, Shelef, 2001; Gonçalves et al. 2005).

Em um estudo com carne moída crua demonstrou-se que o efeito bacteriostático sobre *L. monocytogenes* é mais intenso quando ambos os compostos são aplicados conjuntamente (Mbandi, Shelef, 2001). Outro estudo apresentou resultados semelhantes, demonstrando que a combinação de lactato de sódio a 2% combinado com diacetato de sódio a 0,25%, apresentou efeito listeriosstático por 4 semanas em amostras de salsichas do tipo Frankfurter embaladas a vácuo e mantidas a 4°C (Morey et al. 2014) Este mesmo efeito foi observado em amostras de mortadelas adicionadas de lactato de sódio a 1,8% combinado com diacetato de sódio a 0,25% mantidas a 4°C e também em salsichas Viena e linguiça Bratwurst (Glass et al. 2002).

Em outro estudo realizados com salsichas adicionadas com diversas combinações de compostos com o lactato de sódio, foi demonstrado que sua combinação tanto com o diacetato de sódio quanto o acetato de sódio, ambos em

concentração de 0,25% inibiram completamente o crescimento por 120 dias de armazenamento a 4°C (Samelis et. al., 2001).

3.5. VINAGRE

O ácido acético pode ser obtido de fontes naturais como frutas, cereais entre outros, apresenta uma variedade de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, embora não seja comumente utilizado em sua forma pura na indústria de alimentos, é amplamente empregado na forma de vinagre (Lima, 2014; Moreira, 2011).

O vinagre, que contém ácido acético, é amplamente utilizado na indústria de carnes processadas por suas propriedades benéficas. Atua como conservante natural, regula o pH dos alimentos e inibe o crescimento de bactérias, leveduras e fungos, prolongando assim a vida útil do produto e protegendo contra patógenos de origem alimentar, como *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (Soares, 2022; Ben Braïek, Smaoui 2021; Revista FIB, 2017; Theron, Lues, 2007). Ele exerce um efeito capaz de melhorar a textura e o sabor dos alimentos, sendo notável por sua toxicidade elevada para microrganismos e baixa toxicidade para os seres humanos (de Oliveira, 2006).

Essas características tornam o vinagre uma alternativa natural aos conservantes sintéticos (Soares, 2022; Nunes, 2013), como o lactato de sódio, contribuindo para a redução de aditivos artificiais em produtos cárneos. Além disso, o ácido acético presente no vinagre desempenha um papel crucial na inibição do crescimento de bactérias e outros microrganismos, tornando-se um ingrediente valioso para garantir a segurança alimentar (Soares, 2022).

Portanto, o vinagre não apenas melhora o perfil sensorial dos alimentos, mas também aumenta sua vida útil e segurança, destacando seu valor na indústria alimentícia. Sua utilização pode beneficiar a saúde dos consumidores e proporcionar alimentos mais seguros e saudáveis (Moraes, 2020).

Estudos têm mostrado que o ácido acético pode ser eficaz na redução de microrganismos em carne. Por exemplo, foi observada uma redução significativa na contagem *Enterobacteriaceae*, *E. coli* e *S. typhimurium* em carcaças de carneiro após tratamento com uma solução contendo ácido acético a 3,0% a 55°C (Anderson, 1997). Além disso, o ácido acético a 2,0% também demonstrou ser

eficaz na redução de *Salmonella* em carcaças bovinas (Dickson, Siragusa, 1988). Estudos recentes indicam que diferentes vinagres (como os de damasco e malagueta) tem demonstrado eficácia contra bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua*, bem contra fungos como *Debaryomyces hansenii* e *Cryptococcus neoformans* (Soares, 2022).

Além disso, o uso de vinagre como conservante foi eficaz em cortes de dianteiro bovino, especialmente quando combinado com embalagem a vácuo, demonstrando assim uma eficácia na inibição do crescimento microbiano e na extensão da vida útil. Neste mesmo estudo o tratamento que envolveu o uso de aspersão do vinagre na concentração de 2,0% em cortes dianteiros bovinos desossados e embalados a vácuo se destacou ao apresentar menor crescimento de bactérias lácticas, coliformes e bolores e leveduras durante os primeiros 20 dias de armazenamento a 5°C.

Em estudos realizados por Porto-Fett et al. (2014) em peito de peru fatiado não curado, contaminado artificialmente com *L. monocytogenes* e tratado com vinagre tamponado em concentrações entre 2,0% e 3,0%, os autores verificaram a redução nas contagens do patógeno durante o armazenamento refrigerado. McDonnell, Glass e Sindelar (2013) ao compararem a ação antimicrobiana de vinagre tamponado a 2,5% com uma mistura de lactato de sódio e diacetato de sódio a 2,8% na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* em presunto, constataram que o vinagre tamponado teve melhor efeito que a mistura de sais no retardamento do crescimento da bactéria durante armazenamento a 4°C.

No entanto, é importante notar que concentrações muito elevadas de ácido acético podem afetar negativamente as propriedades sensoriais dos produtos cárneos. Portanto, seu uso deve ser cuidadosamente controlado para evitar alterações no sabor e na aparência dos produtos alimentícios, o limite de uso é de concentrações de 2 - 2,5% podem causar alterações nas características sensoriais desses produtos (Ponrajan et al. 2012; Marques, 2010).

3.6. ACEROLA EM PÓ

A indústria de produtos cárneos enfrenta desafios significativos devido aos efeitos adversos das reações de oxidação (Souto, Almeida, 2021; Shah, Bosco, Mir, 2014; Hygreeva, Pandey, Radhakrishna, 2014). A exploração de antioxidantes

naturais nesses produtos representa uma área promissora de pesquisa e desenvolvimento. Essa abordagem não apenas contribui para a redução do uso de antioxidantes sintéticos, potencialmente prejudiciais à saúde (Ribeiro et al. 2019; Shaheen et al. 2016; Ahmad, et al. 2015), mas também oferece benefícios adicionais relacionados à qualidade sensorial e à segurança de carnes processadas.

Ao considerar ingredientes que possam prevenir ou retardar a oxidação de proteínas e lipídios em carnes processadas, vários fatores devem ser ponderados. Esses incluem a solubilidade em gordura do ingrediente, concentração efetiva, faixa de temperatura ideal, estabilidade do pH, resistência térmica, além de critérios práticos como custo, disponibilidade e conformidade com regulamentações (Oswell, Thippareddi, Pegg, 2018).

A acerola em pó tem sido objeto de estudo como um antioxidante alternativo ao eritorbato de sódio na produção de produtos cárneos processados, especialmente quanto à suscetibilidade desses produtos a reações oxidativas em cadeia, resultando em odores, sabores indesejáveis e perda de nutrientes (Hygreeva, Pandey, Radhakrishna, 2014). Apesar do amplo uso do eritorbato de sódio devido às suas propriedades antioxidantes estabelecidas e à sua capacidade de atuar como acelerador nas reações de cura (Trindade et al. 2008), as preocupações relacionadas à sua segurança e eficácia têm instigado fabricantes a explorarem alternativas mais saudáveis e naturais (Kim et al. 2019).

Nesse contexto, a acerola em pó, como uma fonte natural de vitamina C, emerge como uma opção promissora, oferecendo considerável potencial antioxidante e sendo aplicado para estabilizar cor e aroma em produtos cárneos processados (Tozo, 2022; Realini et al. 2015). Estudos indicam que a acerola em pó não apenas melhora a cor e a estabilidade oxidativa de produtos cárneos processados, mas também exibe propriedades antimicrobianas (Fruet et al. 2019; Realini et al. 2015).

O estudo conduzido por Park, Hong e Yoon (2014) examinou o impacto da adição de acerola em pó em linguças suínas. Os resultados destacaram que a adição da acerola em pó atuou no controle da oxidação contribuindo para a melhora significativa da estabilidade das linguças, resultando em uma extensão significativa da vida útil. Além disso, as linguças tratadas com a acerola em pó exibiram uma

coloração mais vibrante e avermelhada em comparação com o lote de controle tratado com eritorbato de sódio. Os resultados indicaram melhorias na estabilidade oxidativa, cor e textura dos produtos cárneos fatiados com a adição do extrato de acerola.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CEPAS DE *L. monocytogenes* PROVENIENTES DE PRODUTOS CÁRNEOS E AMBIENTE.

4.1.1 Isolamento

O isolamento e a identificação de cepas de *L. monocytogenes* provenientes de diferentes produtos cárneos, incluindo carne bovina e carne suína e ambiente de planta de processamento, foram realizados seguindo o método ISO 11290-1:2017.

Porções de 25g de alimento foram homogeneizadas, por 1 min, com 225ml de caldo Half-Fraser e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h, seguido de um enriquecimento secundário em caldo Fraser. As diluições foram semeadas em Ágar Listeria de Ottaviani & Agosti (ALOA) e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 a 48 h. Para isolar e purificar as cepas características de interesse, foram inoculadas entre cinco e dez colônias típicas de cada amostra em placas de Ágar Trypticase de Soja com extrato de levedura a 0,6% (TSA-YE). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, foram selecionadas cinco colônias representativas de cada placa para confirmação bioquímica.

As análises ambientais foram realizadas utilizando a técnica de swab: o esfregaço foi feito com swabs estéreis, que foram colocados em tubos contendo 10 ml de caldo Half-Fraser e incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h. Em seguida, os tubos foram submetidos aos mesmos passos descritos anteriormente, incluindo o enriquecimento secundário, a semeadura em Ágar Listeria de Ottaviani & Agosti (ALOA), a incubação e a seleção de colônias para confirmação bioquímica.

4.1.2 Caracterização fenotípica dos isolados

A confirmação bioquímica e morfológica incluiu o teste de catalase, coloração de Gram, teste de fermentação de xilose e ramnose, verificação de beta hemólise e de motilidade. Para tanto as colônias selecionadas foram estriadas por esgotamento em placas de ágar TSA-YE para purificação. Antes dos testes a colônia foi cultivada em ágar TSA-YE a 30°C/24 h.

4.1.2.1. Teste de catalase

A partir da placa de ágar TSA-YE, uma alçada da cultura foi transferida para uma lâmina de microscopia. Em seguida, foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%, observando-se a formação de borbulhas decorrentes da produção da enzima catalase.

4.1.2.2. Coloração de gram

A partir da placa de ágar TSA+YE, foi preparado um esfregaço o qual foi submetido à coloração de Gram. As células de *L. monocytogenes* são identificadas como bastonetes curtos Gram-positivos.

4.1.2.3. Teste de fermentação de xilose e ramnose

A partir da placa de ágar TSA-YE, foi inoculada uma alçada em tubos de caldo púrpura base suplementado com 0,5% do carboidrato de interesse e incubada a 35°C por 7 dias. Posteriormente, foi observada a mudança de cor como indicativo de fermentação do carboidrato.

4.1.2.4. Teste de verificação de beta hemólise

A partir da placa de ágar TSA-YE, uma alíquota de cada cultura característica foi inoculada por picada em Ágar Sangue suplementado com sangue de carneiro a 5%, para a verificação de hemólise.

4.1.2.5. Teste de verificação de motilidade

A partir da placa de TSA+YE, inoculou-se cada cultura suspeita em tubos de Ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM), por picada no centro do meio de cultura, até uma distância de 1 cm do fundo. Os tubos foram incubados a 25°C por 7 dias, observando-se a formação de uma zona de migração típica, lembrando um guarda-chuva.

4.1.2. CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS

Após a realização dos testes bioquímicos, cinco colônias suspeitas de *L. monocytogenes* eventualmente presentes foram submetidas ao sequenciamento genético os resultados obtidos foram utilizados para confirmar a presença e identidade da *L. monocytogenes* nas amostras analisadas.

4.1.2.1. EXTRAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA

Para a extração do DNA, 15 isolados foram semeados em placas de Petri contendo Ágar TSA-YE. Após o período de incubação adicionou-se 3,0 ml de água Milli-Q e com o auxílio de uma alça de Drigalski realizou-se a emulsão da cultura com o líquido. O conteúdo da placa foi transferido assepticamente para um tubo de 2,0 ml utilizando uma pipeta de *Pasteur*.

O tubo foi centrifugado a 11000 g por 3 min para formar um precipitado, que foi ressuspenso em 200 µl de água e 800 µl de tampão de lise (6,0 ml de água Milli-Q, 2,0 ml de Tris-HCL 1M, 500 µl de NaCl 5M, 500 µl de EDTA 0,5M e 1,0 ml de Docecil Sulfato de Sódio - SDS 10%). Em seguida, o conteúdo foi homogeneizado no vórtex com pérolas de vidro por 5 min no vórtex e incubado em banho-maria a 70°C por 10 min, quando novamente foi homogeneizado por 5 min no vórtex. O tubo foi centrifugado a 11000 g por 1 min, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 2,0 ml.

Ao novo tubo, foi adicionado um volume equivalente da amostra de clorofórmio, sendo em seguida homogeneizado antes da centrifugação a 11000 g por 2 min para separação das fases. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo de 1,5 ml, o qual foi adicionado de 10% do volume da amostra de NaCl 3M e

o dobro do volume da amostra de etanol. O conteúdo foi homogeneizado novamente no vórtex e deixado para repousar no freezer a -18°C por 40 min, após a centrifugação a 11000 g por 5 min o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi lavado com 300 µl de etanol para remover o excesso de sal. O precipitado foi centrifugado novamente a 11000 g por 1 min e o sobrenadante foi descartado novamente e deixado para secar em estufa regulada a 42°C por 25 min.

O DNA foi diluído em 100 µl água ultrapura e colocado na geladeira para descansar *overnight*. Para a execução da eletroforese, adicionou-se ao gel de agarose 1% uma amostra com 5 µl de DNA, bem como 2 µl de *ficoll*. A eletroforese foi então conduzida por um período de 1 h a uma corrente de 90 V.

Após a eletroforese, o gel foi imerso por 10 min em banho de brometo de etídio (0,5 µg/ml), permitindo a visualização e a verificação da integridade do DNA sob luz UV.

4.1.2.2. AMPLIFICAÇÃO VIA PCR E SEQUENCIAMENTO

O método de identificação de *L. monocytogenes* envolveu a utilização do sequenciamento do rRNA 16S (Felske et al. 1997) com base nos primers F27 (Heuer et al. 1997) e U2 (Lu et al. 2000). A amplificação via PCR foi realizada em um volume final de 25 µl, com as seguintes condições de termociclagem: uma desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguida por 35 ciclos de 40 s a 95°C, 40s a 57 °C, 1 min e 45 s a 72°C, e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o reagente ExoSAP-ITTM PCR Product Cleanup (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A região 16s foi sequenciada com ambos os primers F27 e U2 utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA) em um analisador SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram comparadas por meio de alinhamento local utilizando a ferramenta BLAST (Altschul, 1990) contra os bancos de dados do NCBI [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].

4.1.3. CULTURAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Em todas as atividades deste estudo foram usadas como referência as culturas de *L. monocytogenes* da *American Type Culture Collection* ATCC (ATCC 7644, ATCC 19117, ATCC 15313 e ATCC 19112), obtidas no Instituto nacional de controle de qualidade em saúde - INCQS pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Foram utilizadas, adicionalmente, duas cepas isoladas e identificadas de *L. monocytogenes* (AM12-12 e AM14-14) provenientes de produtos cárneos (Item 5.1). Culturas estoque de *L. monocytogenes* foram mantidas em caldo TSB-YE, suplementado com 15% de glicerol, a -82°C (Health Canada, 2012). Para conservação em curto prazo, as culturas foram mantidas em ágar TSA-YE e armazenadas a 4±1°C. Antes do uso, as culturas foram reativadas em caldo TSB+YE e incubadas a 35°C por um período de 24 h.

4.2. TRIAGEM IN VITRO DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS ALTERNATIVOS NATURAIS E TRADICIONAIS PARA O PROCESSAMENTO DA LINGUIÇA CALABRESA

O potencial antimicrobiano de ingredientes que, conforme estabelecido pelo FSIS em 2006, se classificam na definição de “natural”, foram testados sobre as seis cepas de *L. monocytogenes*, onde incluíam misturas de ácidos orgânicos, extratos de plantas e subprodutos de fermentação microbiana. Também foram testados ingredientes considerados sintéticos, aprovados para uso em produtos pela ANVISA.

Sete ingredientes de fontes naturais e cinco de origem sintética quanto à capacidade de inibir *L. monocytogenes*. Para avaliar o potencial antimicrobiano de aditivos sobre as culturas isoladas utilizou-se a técnica de diluição em microplacas (96 poços), conforme o Manual 37 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018 adaptado), para bactérias aeróbicas. As concentrações dos aditivos foram selecionadas com base nas recomendações dos fornecedores e nas regulamentações vigentes. Os aditivos, incluindo aditivos sintéticos, extrato natural de aipo, acerola em pó e um blend comercial, foram fornecidos por empresas de ingredientes em colaboração com o Instituto.

Para preparar os aditivos, foram empregadas duas maneiras distintas. Os compostos líquidos foram adicionados diretamente ao meio de cultura, enquanto os compostos em pó foram solubilizados em água deionizada estéril para compor uma solução com concentração a 10%. Em seguida, o volume necessário de cada solução para obter-se a concentração estabelecida foi calculado e então, adicionado aos 10 ml de caldo TSB-YE em dupla concentração.

Um total de 12 compostos foram avaliados, realizando-se testes isoladamente com os mesmos e também por meio de testes de soluções contendo uma combinação dos compostos avaliados, totalizando 31 combinações. As soluções foram preparadas de modo a simular compostos análogos à formulação planejada para o lote experimental (Tabela 2).

- 1) Vinagre A (vinagre em pó (concentração não divulgada))
- 2) Vinagre B (vinagre tamponado (concentração não divulgada))
- 3) Dextrose fermentada (concentração não divulgada))
- 4) Acerola em pó (34% de ácido ascórbico)
- 5) Extrato de aipo ($\approx$ 3,3% de teor de nitrito de sódio e 30% de sal marinho).
- 6) Substituto de fosfato (extrato de levedura e extrato cítrico (concentração não divulgada))
- 7) *Blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada (concentração não divulgada))
- 8) *Blend* comercial B (52,9% de lactato de sódio, 9,4% de acetato de sódio).
- 9) Sal de cura (90% de sal e 10% de nitrito de sódio)
- 10) Sal marinho
- 11) Lactato de sódio (59,8% e 12,3% de sódio)
- 12) Diacetato de sódio (39% de ácido acético 59% de acetato de sódio)
- 13) Solução A: Combinação de vinagre A e dextrose fermentada.
- 14) Solução B: Combinação de vinagre B e dextrose fermentada.
- 15) Solução C: Combinação de extrato de aipo ($\approx$ 3,3% de teor de nitrito de sódio e 30% sal marinho), acerola em pó (34% ácido ascórbico) e vinagre A (vinagre em pó (concentração não divulgada)).
- 16) Solução D: Combinação de extrato de aipo ($\approx$ 3,3% de teor de nitrito de sódio e 30% de sal marinho), acerola em pó (34% de ácido ascórbico), substituto de

fosfato (extrato de levedura e extrato cítrico (concentração não divulgada)) e vinagre A (vinagre em pó (concentração não divulgada)).

17) Solução E: Combinação de extrato de aipo ($\approx 3,3\%$ de teor de nitrito de sódio e 30% de sal marinho), acerola em pó (34% de ácido ascórbico), sal marinho e vinagre A (vinagre em pó (concentração não divulgada)).

18) Solução F: Combinação de extrato de aipo ($\approx 3,3\%$ de teor de nitrito de sódio e 30% de sal marinho), acerola em pó (34% de ácido ascórbico) e *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada (concentração não divulgada)).

19) Solução G: Combinação de extrato de aipo ($\approx 3,3\%$ de teor de nitrito de sódio e 30% de sal marinho), acerola em pó (34% de ácido ascórbico), substituto de fosfato (extrato de levedura e extrato cítrico (concentração não divulgada)), *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada (concentração não divulgada)).

20) Solução H: Combinação de extrato de aipo ($\approx 3,3\%$ de teor de nitrito de sódio e 30% de sal marinho), acerola em pó (34% de ácido ascórbico), sal marinho e *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada (concentração não divulgada)).

21) Solução I: Combinação de extrato de aipo ($\approx 3,3\%$ de teor de nitrito de sódio e 30% de sal marinho), acerola em pó (34% de ácido ascórbico), vinagre A (vinagre em pó (concentração não divulgada)) e dextrose fermentada (concentração não divulgada).

22) Solução J: Combinação de sal de cura (90% de sal e 10% de nitrito de sódio), lactato de sódio (59,8% e 12,3% de sódio), diacetato de sódio (39% de ácido acético 59% de acetato de sódio) e eritorbato de sódio (99,99%).

23) Solução K: Combinação de sal de cura (90% de sal e 10% nitrito de sódio), lactato de sódio (59,8% e 12,3% de sódio), diacetato de sódio (39% de ácido acético 59% de acetato de sódio), eritorbato de sódio (99,99%) e sal marinho.

24) Solução L: Combinação de sal de cura (90% de sal e 10% nitrito de sódio), *Blend* comercial B (52,9% de lactato de sódio, 9,4% de acetato de sódio e 13,6% de sódio) e eritorbato de sódio (99,99%).

25) Solução M: Combinação de sal de cura (90% de sal e 10% nitrito de sódio), *Blend* comercial B (52,9% de lactato de sódio, 9,4% de acetato de sódio e 13,6% de sódio), eritorbato de sódio (99,99%) e sal marinho.

26) Solução N: Combinação de sal de cura (90% de sal e 10% nitrito de sódio), lactato de sódio (59,8% e 12,3% de sódio) e diacetato de sódio (39% de ácido acético 59% de acetato de sódio).

27) Solução O: Combinação de lactato de sódio (59,8% e 12,3% de sódio) e diacetato de sódio (39% de ácido acético 59% de acetato de sódio).

30) Solução P: Combinação de sal de cura (90% de sal e 10% nitrito de sódio), *Blend* comercial B (52.9% de lactato de sódio, 9,4% de acetato de sódio e 13.6% de sódio).

31) Solução Q: Combinação de ($\approx$ 3,3% de teor de nitrito de sódio e 30% sal marinho) *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada (concentração não divulgada)).

Tabela 2. Concentrações testadas para triagem dos ingredientes no teste de microdiluição.

Aditivos / Soluções		Concentrações %
Vinagre A		0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00
Vinagre B		0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00
Dextrose fermentada		0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50
Acerola em pó		0,17
Extrato de aipo		0,45
Substituto de fosfato		0,50; 1,00
<i>Blend</i> comercial A		0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50
<i>Blend</i> comercial B		0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00
Sal de cura		0,15
Sal marinho		1,00; 1,82; 2,50
Lactato de sódio		0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00
Diacetato de sódio		0,05; 0,08; 0,10
Solução A	Vinagre A	0,25; 0,75; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00
	Dextrose fermentada	0,20; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00
Solução B	Vinagre B	0,75; 1,50
	Dextrose fermentada	0,75; 1,00
Solução C	Extrato de Aipo	0,45
	Acerola em pó	0,17
	Vinagre A	1,50
Solução D	Extrato de Aipo	0,45
	Acerola em pó	0,17
	Substituto de fosfato	1,00
	Vinagre A	1,50
Solução E	Extrato de Aipo	0,45
	Acerola em pó	0,17

	Sal	1,80
	Vinagre A	1,50
Solução F	Extrato de Aipo	0,45
	Acerola em pó	0,17
	<i>Blend</i> comercial A	1,50
Solução G	Extrato de Aipo	0,45
	Acerola em pó	0,17
	Substituto de fosfato	1,00
	<i>Blend</i> comercial A	1,50
Solução H	Extrato de Aipo	0,45
	Acerola em pó	0,17
	Sal	1,80
	<i>Blend</i> comercial A	1,50
Solução I	Extrato de Aipo	0,45
	Acerola em pó	0,17
	Vinagre A	0,75
	Dextrose fermentada	0,75
Solução J	Sal de cura	0,15
	Lactato de sódio	2,00
	Diacetato de sódio	0,10
	Eritorbato de sódio	0,05
Solução K	Sal de cura	0,15
	Lactato de sódio	2,00
	Diacetato de sódio	0,10
	Eritorbato de sódio	0,05
	Sal marinho	1,83
Solução L	Sal de cura	0,15
	<i>Blend</i> comercial B	1,00; 1,50
	Eritorbato de sódio	0,05
Solução M	Sal de cura	0,15
	<i>Blend</i> comercial B	2,00
	Eritorbato de sódio	0,05
	Sal marinho	1,83
Solução N	Sal de cura	0,15
	Lactato de sódio	2,00
	Diacetato de sódio	0,10
Solução O	Lactato de sódio	0,25; 1,00; 2,00
	Diacetato de sódio	0,05; 0,08; 0,10
Solução P	Sal de cura	0,15
	<i>Blend</i> comercial B	1,00; 1,50
Solução Q	Extrato de aipo	0,45
	<i>Blend</i> comercial A	1,00

Blend comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada); Blend comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio)

No preparo da microplaca, 100 µl do meio de cultura contendo o composto na concentração estabelecida foram distribuídos em cada um dos 96 poços da placa, juntamente com 100 µl da cultura ativa padronizada em 3 log UFC/ml. Em todos os testes realizados, foram incluídos controles do crescimento microbiano: positivo (+) contendo caldo TSB+YE junto ao inóculo, negativo (-) contendo caldo TSB+YE e os ingredientes sem a presença do inóculo, branco e contendo apenas o caldo TSB+YE. A microplaca foi incubada a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h (Figura 1). Após o período de incubação, 25 µl de solução de Cloreto de Trifenil Tetrazólio (TTC) a 0,1% foram adicionados a cada poço, e uma segunda incubação nas mesmas condições foi realizada por 4 h. Após esse período foi possível observar a viragem de cor em cada poço, o que permitiu avaliar o crescimento microbiano.

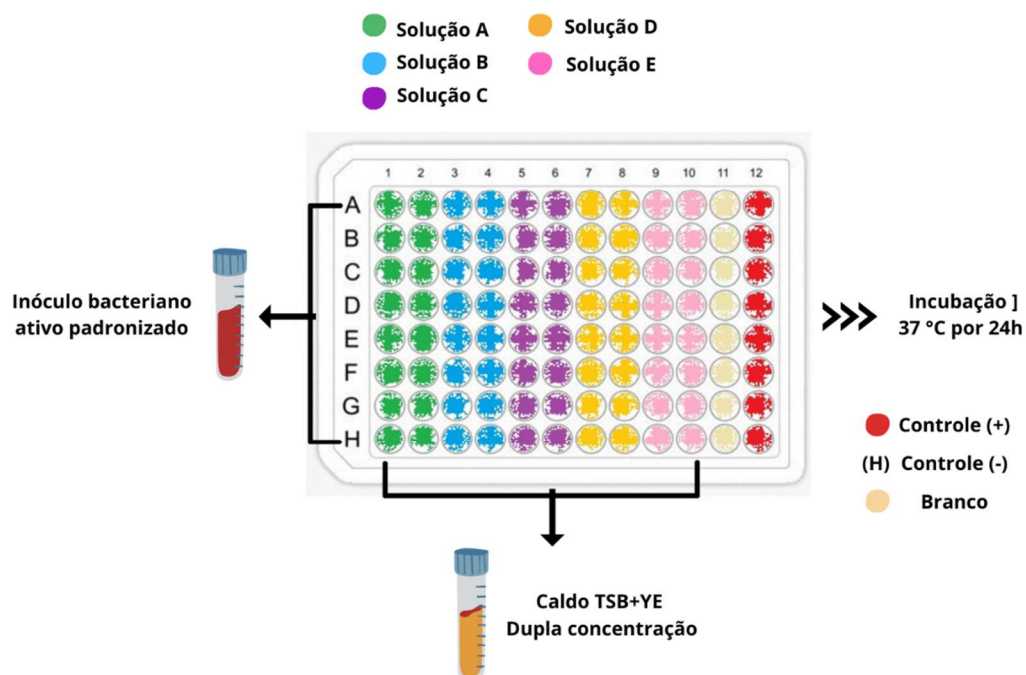


Figura 1. Determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição.

4.3. PROCESSAMENTO DOS LOTES EXPERIMENTAIS DA LINGUIÇA CALABRESA COZIDA

4.3.1. MATÉRIAS-PRIMAS E INGREDIENTES

Os aditivos e matérias primas, utilizados na produção do lote experimental, foram adquiridos pelo Centro de Tecnologia de Carnes (CTC/Ital) por intermédio de empresas colaboradoras do Instituto. A matéria-prima carne e os aditivos naturais, incluindo extrato natural de aipo, acerola em pó e o *blend* comercial, foram fornecidos por empresas de ingredientes.

4.3.2. PROCESSAMENTO DOS LOTES EXPERIMENTAIS DAS AMOSTRAS

Dois lotes experimentais de linguiças calabresa cozida, totalizando 10 kg cada tratamento, foram produzidos na planta piloto de processamento de produtos cárneos do CTC/Ital. Eles foram elaborados a partir de uma formulação comercial padrão. Em cada repetição experimental foram elaboradas três formulações

distintas, como descrito na Tabela 3. A escolha dos ingredientes baseou-se nos testes *in vitro* (item 4.2), selecionando aqueles que apresentaram as melhores respostas nas condições testadas.

Tabela 3. Formulações para linguiças calabresas cozidas: tratamentos tradicional, alternativo e controle.

Matérias-primas / Aditivos	Tradicional	Alternativo	Controle
	%	%	%
Paleta suína	41,50	39,60	42,56
Copa	35,00	35,00	35,00
Toucinho	12,00	12,00	12,00
Água gelada	8,00	8,00	8,00
Sal	1,00	1,81	1,14
Extrato de aipo	0,00	0,63*	0,00
Sal de cura	0,15	0,00	0,00
Acerola em pó	0,00	0,16	0,00
Eritorbato de sódio	0,05	0,00	0,00
Açúcar	0,30	0,30	0,30
Condimento linguiça calabresa	1,00	1,00	1,00
Blend comercial A	0,00	1,50	0,00
Blend comercial B	1,00	0,00	0,00
TOTAL	100	100	100

Tradicional: sal de cura, eritorbato de sódio e *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio);

Alternativo extrato de aipo, acerola em pó e *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada)

Controle: sem adição de fonte de nitrito, antioxidante e antimicrobiano.

(*) Valor variável entre os processos;

Na elaboração da linguiça calabresa cozida, o processo inicial envolveu a moagem das matérias-primas, iniciando com a paleta suína utilizando um disco de 16 mm, seguindo pelo retalho suíno moído com um disco de 12 mm, e o toucinho congelado passando pelo processo de moagem utilizando um disco de 8 mm. Em seguida, a massa cárnea foi homogeneizada (M60, C.A.F., Brasil) durante aproximadamente 1 min, incorporando o sal, condimentos, sal de cura/extrato vegetal e água. Posteriormente, o toucinho foi adicionado à massa que foi submetida a outra etapa de homogeneização de cerca de 1 min. Em seguida, adicionou-se o açúcar, o eritorbato de sódio ou acerola em pó e o *blend* comercial A ou B, e a mistura foi homogeneizada por um tempo total de aproximadamente 5 min.

As massas de cada um dos tratamentos foram embutidas na embutidora a vácuo (VF610 Plus, Handtmann Ltda., Brasil), em envoltório de celulose permeável com calibre de embutimento 42 mm sendo que cada gomo pesava aproximadamente 500 g. Os diferentes tratamentos foram encaminhadas para o processo de cozimento em estufa (HR1, Schröter Technology, Alemanha), que se iniciou com o pré-aquecimento a 40°C por 10 min, seguido de secagem a 55°C por 20 min, defumação a 55°C por 15 min e a 60°C por 30 min, finalizando-se com duas etapas de secagem por 40 min a 65°C e 70°C. Em seguida, o cozimento foi aplicado com temperatura de 76°C até a temperatura no centro do produto atingir 72°C, seguido de uma última secagem a 80°C por 20 min. O produto foi resfriado até atingir 20°C (Figura 2).

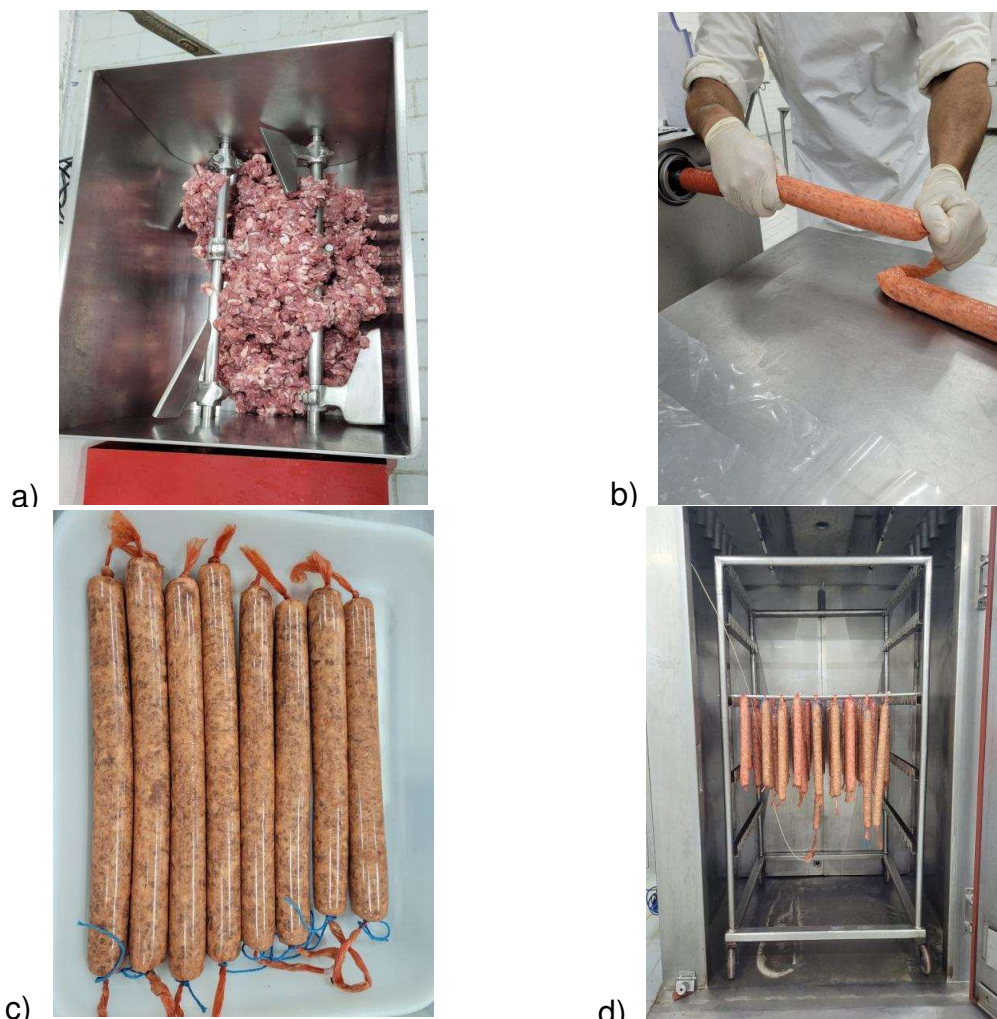


Figura 2. Detalhes do processamento da linguiça calabresa. a) Homogeneização da matéria prima cárnea e ingredientes adicionados; b) Embutimento uniforme da massa em envoltório de celulose; c) Amostras de linguiças já embutidas; d) Preparação para o processo de cozimento.

A determinação da perda de peso por cozimento (PPC) foi calculada conforme a metodologia descrita por Honikel (1998), onde *PI* é o peso inicial e *PF* é o peso final. O resultado foi expresso em porcentagem, proporcionando uma medida quantitativa da perda de peso ocorrida durante o processo de cozimento.

$$PPC = \frac{(PI - PF)}{PI} \times 100$$

Após o cozimento, as linguiças calabresas íntegras, ainda envoltas em tripa, foram armazenadas a 4°C por 6 dias antes de serem encaminhadas para o fatiamento.

4.3.3. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

A caracterização microbiológica das amostras foi realizada após 24h do processamento. Para tanto, três amostras de cada tratamento de linguiça calabresa foram avaliadas. As tripas de celulose foram removidas em condições assépticas e encaminhadas para a realização dos seguintes ensaios microbiológicos, contagem de bactérias lácticas (ISO 15214:1998), estafilococos coagulase positiva (ISO 6888-1:2021), *Clostridium perfringens* (LABBE, 2015), *Escherichia coli* (ISO 16649-2:2001), *L. monocytogenes* (ISO 11290-2:2017) e detecção de *Salmonella* spp. (ISO 6579:2020).

4.3.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS

Após 24 horas do processamento, foi realizada a caracterização físico-química das amostras recém processadas. As análises foram realizadas em triplicatas de amostra e incluiu a determinação de umidade, teor de proteínas, gordura, cinzas, atividade de água, pH e as concentrações de nitrito de sódio e nitrato de sódio (BRASIL, 2018).

4.4. TESTE DE DESAFIO

As atividades relacionadas ao teste de desafio foram conduzidas no laboratório de teste de desafio do CTC/Ital, seguindo o protocolo estabelecido pelo de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para consumo refrigerados (Health Canada, 2012).

Para considerar a variação no crescimento e sobrevivência das culturas de *L. monocytogenes*, o estudo de desafio foi conduzido utilizando um *pool* contendo seis cepas diferentes, dentro dessas, quatro cepas de referência e duas isoladas anteriormente (item 4.3.1).

4.4.1. PREPARO DO POOL DE CEPAS DE *L. monocytogenes*

As culturas de *L. monocytogenes* ATCC 7644, ATCC 19117, ATCC 15313 e ATCC 19112, AM12-12 e AM14-14, foram usadas nos testes e foram ativadas em caldo TSB-YE com incubação a 37°C por 18 h.

A concentração de cada cultura de *L. monocytogenes* usadas para a inoculação artificial das amostras de linguiças calabresa cozida e fatiadas foi padronizada na escala de MacFarland, correspondente a 8 log/ml com o auxílio do Densimat® (bioMérieux, Densimat®). Após a ativação e padronização das culturas, estas foram combinadas em um único frasco estéril e homogeneizadas para formar o *pool* de cepas.

4.4.2. PREPARO DAS AMOSTRAS DE LINGUIÇA PARA O TESTE DE DESAFIO

Após seis dias do processamento, as tripas de celulose das amostras de linguiça calabresa cozida foram retiradas e as peças foram manualmente fatiadas com o auxílio de utensílios estéreis, em condições assépticas. As fatias de espessura de aproximadamente 3 mm, foram acondicionadas em filme de alta barreira com dimensões de 35x25 cm embaladas a vácuo e mantidas a 4°C por 24 h.

Posteriormente, cerca de 5 fatias (aproximadamente 25 g) foram distribuídas em filmes estéreis de alta barreira, com dimensões de 20x25 cm, totalizando 50 unidades de pacotes por tratamento Tradicional, Alternativo, Controle. Estes foram divididos em dois grupos, sendo um inoculado artificialmente com *L. monocytogenes* e o outro não inoculado. Para as amostras destinadas às análises físico-químicas, foram preparadas amostras contendo aproximadamente 50 g (10 fatias) por saco.

4.4.3. CONTAMINAÇÃO EXPERIMENTAL DAS AMOSTRAS

A contaminação experimental das fatias de linguiça com *L. monocytogenes* foi realizada de acordo com o recomendado pelo protocolo do Canadá (Health Canada, 2012). No teste experimental as amostras foram inoculadas em duas concentrações de inóculo. A concentração de 4 log foi escolhida para avaliar a atividade antimicrobiana dos compostos em uma carga alta, bem como a eficácia dos agentes antimicrobianos e realizar testes de letalidade pós-processamento (SCOTT et al., 2005). Já a segunda concentração, mais baixa, de 2 log, próxima ao limite de detecção, possibilitou a investigação do potencial de crescimento de *L. monocytogenes* (Augustin et al., 2010).

Antes da contaminação experimental, cinco fatias de cada lote foram caracterizadas para avaliar a possível contaminação de *L. monocytogenes* nos lotes produzidos empregando-se a metodologia ISO 11290-2:2017.

Amostras de linguiça calabresa cozida foram inoculadas com o *pool* de *L. monocytogenes* com as concentrações predeterminadas.

Para tanto, cada pacote contendo aproximadamente 25g de amostra foi inoculado assepticamente, com um volume de 100µl com o *pool* de *L. monocytogenes* com o auxílio de uma micropipeta e massageada manualmente por aproximadamente 30s para assegurar a distribuição uniforme do inóculo na superfície das fatias. Amostras de linguiça fatiadas não inoculadas com as culturas de *L. monocytogenes* foram usadas como controle dos testes. Ambas, foram embaladas a vácuo em filme de alta barreira e, foram armazenadas em câmara fria regulada a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 75 dias (Figura 3).

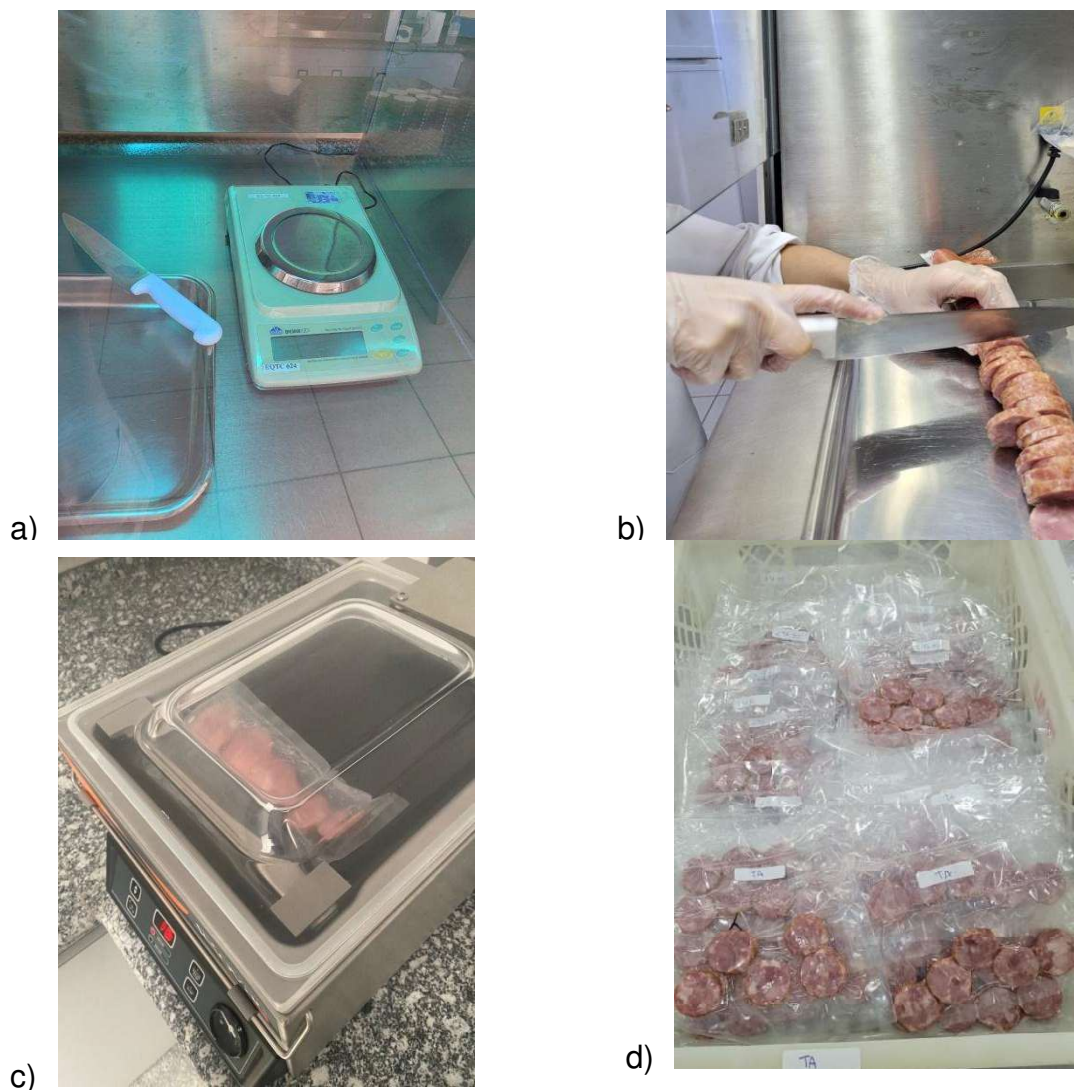


Figura 3. Processo de fatiamento, de embalagem e armazenamento das amostras de linguiça calabresa cozida e fatiadas. a) Utensílios em luz UV; b) Fatiamento em ambiente estéril. c) Processo de embalagem a vácuo; d) Amostras após o processo de vácuo.

4.4.4. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO DE *L. monocytogenes* DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO

Para avaliar a inibição de *L. monocytogenes* em amostras de linguiças calabresas cozidas e fatiadas adicionadas de agentes antimicrobianos sintéticos e alternativos, foram realizadas avaliações laboratoriais em triplicata de amostras no 1º, 15º, 30º, 45º, 60º e 75º dia de armazenamento. As contagens de *L. monocytogenes*, foi realizada de acordo com o método da ISO 11290-2:2017, além da contagem e de bactérias lácticas conforme ISO 15214:1998, a qual foi realizada

para avaliar a microbiota natural do produto (Health Canada, 2012). Os resultados dos microrganismos foram expressos em log UFC/g e realizadas em todas as amostras, tanto inoculadas quanto não inoculadas.

4.5.5. AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE O ARMAZENAMENTO

As características físico-químicas dos produtos, incluindo os valores de pH e atividade de água, nitrito de sódio, nitrato de sódio (BRASIL, 2018). Foram avaliadas em triplicata de amostras de cada lote do produto nos períodos aproximados de 15, 30, 45, 60 e 75 dias.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em triplicata, os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa STATISTICA®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *L. MONOCYTOGENES*

Foram isoladas um total de 47 colônias características, provenientes de 5 amostras, sendo elas amostras de presunto suíno (18 colônias), hambúrguer (16 colônias), linguiça frescal (8 colônias) e ralo da planta piloto (5 colônias). Confirmou-se a presença de *L. monocytogenes* nas amostras de presunto fatiado e hambúrguer (Tabela 4).

Tabela 4. Detecção de *L. monocytogenes* em amostras de produtos cárneos e de ambiente de planta processadora por meio de método de cultivo celular e molecular.

Código	Descrição amostra	Meio ALOA	Testes Bioquímicos							Confirmação por sequenciamento
			Catalase	Gram	Morfologia	Motilidade	Xilose	Ramnose	B-Hemólise	
AM-1	Linguiça calabresa cozida	Negativo	*	*	*	*	*	*	*	*
AM-7	Linguiça calabresa cozida	Negativo	*	*	*	*	*	*	*	*
AM-8	Presunto	Negativo	*	*	*	*	*	*	*	*
AM-9	Acém	Negativo	*	*	*	*	*	*	*	*
AM-10	Mortadela fatiada	Negativo	*	*	*	*	*	*	*	*
AM-11	Peito de peru fatiado	Negativo	*	*	*	*	*	*	*	*
AM-12	Presunto fatiado	Positivo	+	+	+	+	-	+	-	<i>L. monocytogenes</i> (98,25 %) -
AM-13	Presunto fatiado	Positivo	+	+	+	ND	-	+	-	
AM-14	Hambúrguer	Positivo	+	+	+	+	-	+	-	<i>L. monocytogenes</i> (97,03 %) -
AM-16	Linguiça frescal	Positivo	+	+	+	ND	-	+	-	
SW-1	Máquina fatiadora	Negativo	*	*	*	*	*	*	*	*
Sw-2	Ralo planta piloto	Positivo	-	-	*	*	*	*	*	*

(+) Positivo; (-) Negativo; (*): teste não aplicável; ND: não determinado.

Embora não tenha sido detectada *L. monocytogenes* nas amostras AM-13 (presunto fatiado) e AM-16 (linguiça frescal), é importante ressaltar que o gênero *Listeria* foi identificado, o que sugere a necessidade de investigação adicional para determinar as espécies presentes nos alimentos. Deve-se notar que *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* têm sido esporadicamente associadas a doenças humanas, enfatizando ainda mais a importância de investigações adicionais (MATEUS et al. 2018; Barancelli et al. 2020).

A identificação das duas cepas de *L. monocytogenes*, provenientes das amostras de presunto fatiado (AM-13) e hambúrguer (AM-14), foi confirmada por

meio de testes bioquímicos e moleculares. Ambas as cepas apresentaram fermentação de ramnose, enquanto a fermentação de xilose não foi observada. Além disso, as cepas testaram positivo para catalase e apresentaram a motilidade característica da *Listeria*, semelhante ao formato de um guarda-chuva. Embora o teste de beta-hemólise tenha produzido resultados negativos para ambas as cepas, foram realizados testes moleculares para identificação adicionais devido à possibilidade de cepas de *L. monocytogenes* produzirem resultados negativos neste teste específico (ISO 11290-2:2017).

A identificação molecular das culturas foi confirmada por meio da técnica de PCR, seguida pelo sequenciamento da região 16S (rRNA). As cepas sequenciadas apresentaram 98,25% de compatibilidade com *L. monocytogenes* para amostra AM12-12 (presunto fatiado) e 97,03% de compatibilidade com *L. monocytogenes* para amostra AM14-14 (hambúrguer) de acordo com o BLAST.

Além disso, foi construída uma árvore filogenética de máxima verossimilhança com auxílio do programa Mega11 para posicionar as cepas analisadas de acordo com o seu perfil evolutivo. Essa análise filogenética fornece uma perspectiva adicional sobre as relações evolutivas das cepas estudadas e sua posição dentro do gênero *Listeria*, confirmando a identificação das cepas testadas.

5.2. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA IN VITRO

Dentre os compostos avaliados, três ingredientes demonstraram efeito inibitório sobre o crescimento das seis cepas de *Listeria monocytogenes* no estudo *in vitro*. Entre as formulações testadas, duas combinações de fontes naturais apresentaram atividade antimicrobiana satisfatória contra o patógeno. Além disso, todas as formulações que continham sal de cura exibiram ação inibitória, reforçando a eficácia do tratamento tradicional.

Os resultados indicaram (Tabela 5) que o *blend* comercial A, composto por vinagre tamponado e dextrose fermentada, foi o mais eficiente dentre os compostos testados, demonstrando ação inibitória do crescimento das seis cepas de *L. monocytogenes*.

O *blend* A, composto comercial constituído por vinagre em pó e dextrose fermentada, apresentou ação inibitória sobre as culturas na concentração de 1,50%, porém verificou-se que um de seus componentes, o vinagre em pó, foi

inibitório em concentração de 1,00% para o crescimento das culturas ATCC 15313 e ATCC 19117 (Tabela 5). Os demais ingredientes testados de forma isolada, o vinagre B, a acerola em pó, o extrato de aipo, o substituto de fosfato e a dextrose fermentada não apresentaram ação inibitória do crescimento das culturas avaliadas.

Tabela 5. Ação antimicrobiana (%) de aditivos provenientes de fontes alternativas isolados contra cepas de *L. monocytogenes*.

<i>L. monocytogenes</i>	Vinagre A	Vinagre B	Blend* comercial A	Acerola em pó	Extrato de aipo	Substituto de fosfato**	Dextrose fermentada
ATCC 15313	1,00 ^f	ND	1,50	ND	ND	ND	ND
ATCC 19112	1,50	ND	1,50	ND	ND	ND	ND
ATCC 19117	1,00 ^f	ND	1,50	ND	ND	ND	ND
ATCC 7644	1,50	ND	1,50	ND	ND	ND	ND
AM12-12	1,50	ND	1,50	ND	ND	ND	ND
AM14-14	1,50	ND	1,50	ND	ND	ND	ND

n = 3; ND: não detectado efeito antimicrobiano na faixa de concentração testada; f: ação inibitória fraca/insuficiente; (*) vinagre e dextrose fermentada; (**) extrato de levedura e extrato cítrico.

Tabela 6. Ação antimicrobiana (%) de aditivos combinados provenientes de fontes alternativas contra cepas de *L. monocytogenes*.

<i>L. monocytogenes</i>	Solução								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
ATCC 15313	1,50	1,50	2,12	ND	3,92	2,12	ND	3,92	3,92
ATCC 19112	2,50	1,50	2,12	ND	ND	2,12 ^f	ND	3,92	3,92
ATCC 19117	1,50	1,50	2,12	ND	3,92 ^f	2,12 ^f	ND	ND	ND
ATCC 7644	0,45	1,50	2,12	ND	3,92	2,12 ^f	ND	3,92	3,92
AM12-12	2,50	1,50	2,12	ND	ND	2,12 ^f	ND	3,92	ND
AM14-14	2,50	1,50	2,12	ND	ND	2,12 ^f	ND	ND	ND

n = 3; ND: não detectado na faixa de concentração testada;

(f): ação inibitória fraca/insuficiente;

Solução A: vinagre A + dextrose fermentada;

Solução B: vinagre B + dextrose fermentada;

Solução C: extrato de aipo + acerola em pó + vinagre A;

Solução D: extrato de aipo + acerola em pó + substituto de fosfato + vinagre A;

Solução E: extrato de aipo + acerola em pó; sal; vinagre A;

Solução F: extrato de aipo + acerola em pó + *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada);

Solução G: extrato de aipo + acerola em pó + substituto de fosfato + *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada);

Solução H: extrato de aipo + acerola em pó + sal + *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada);

Solução I: extrato de aipo + acerola em pó + vinagre A + dextrose fermentada.

Para compreender as interações entre os ingredientes, foram formuladas diversas soluções (Tabela 6), explorando possíveis efeitos antagônicos ou

sinérgicos sobre o crescimento de *L. monocytogenes*. Cada solução foi identificada por uma letra para facilitar a referência e análise.

No caso do vinagre B, devido à falta de efeito observado quando aplicado sozinho, foi decidido incluí-lo apenas em uma solução combinada com a dextrose fermentada (solução B), a fim de avaliar se a presença da dextrose fermentada poderia potencializar seu efeito sobre o crescimento de *L. monocytogenes*.

Observou-se que a adição da solução A, contendo Vinagre A e dextrose fermentada ocasionou a inibição das culturas de *L. monocytogenes*. A Solução B, constituída por vinagre B e dextrose fermentada, por sua vez, apresentou efeito inibitório sobre todas as culturas na concentração de 1,50%.

Ao analisar a solução F, composta *Blend* comercial A 1,50%, extrato de aipo a 0,45% e o acerola em pó a 0,17%, a eficácia do *Blend* apresentou uma diminuição, resultando em uma inibição fraca sobre todas as culturas. Essa diminuição na atividade inibitória pode ser atribuída a possíveis interações entre os ingredientes quando combinados.

No composto com extrato de aipo a 0,45%, acerola em pó a 0,17%, *blend* comercial A a 1,50% e sal a 1,80% (Solução H), constatou-se ação antimicrobiana apenas sobre quatro culturas testadas, não havendo efeito inibitório sobre as culturas ATCC 19117 e AM14-14. Este fenômeno sugere que a *L. monocytogenes*, embora seja suscetível a antimicrobianos, está cada vez mais apresentando cepas resistentes, especialmente quando se trata de alimentos. Essa resistência é influenciada pela exposição excessiva a esses agentes ocasionando variações genéticas e ambientais, resultando em diferentes respostas aos antimicrobianos. Certas cepas de *L. monocytogenes* podem permanecer sensíveis a determinados agentes antimicrobianos, enquanto outras podem demonstrar resistência (Haubert et al. 2018; Ávila et al. 2021). Esse perfil varia conforme a exposição e a seleção dos antimicrobianos, bem como as condições ambientais encontradas na matriz em que essas bactérias estão presentes. Isso destaca claramente como as interações e concentrações dos ingredientes desempenham um papel crucial na ação inibitória.

Por outro lado, ao se testar a solução G contendo extrato de aipo a 0,45% acerola em pó a 0,17%, substituto de fosfato a 1,00% e o *blend* comercial A a 1,50%, foi verificado o crescimento das culturas. Isso pode ser atribuído à presença

de extrato de levedura na solução, que podem ter contribuído para o crescimento de *L. monocytogenes*. A interação entre este componente e os compostos antimicrobianos usados na solução podem ter levado à inativação dos mesmos. Desta forma, destaca-se a importância de se avaliar cuidadosamente os efeitos das substituições de ingredientes na conservação de alimentos.

A Solução C, constituída por extrato de aipo a 0,45%, acerola em pó a 0,17% e vinagre A a 1,50%, apresentou ação antimicrobiana mais eficaz em comparação com a Solução F que incluía o *blend* comercial A ao invés do vinagre isolado.

No entanto, ao avaliar-se a Solução E, composta por extrato de aipo 0,45%, acerola em pó 0,17% e vinagre isolado A 1,50% e sal a 1,80%, observou-se uma redução na ação antimicrobiana em relação a solução C, pois apenas três culturas tiveram o crescimento inibido.

É relevante ressaltar que, apesar do vinagre isolado A também ter apresentado uma eficiência semelhante ao *blend* comercial A (Tabela 5), a concentração testada era superior àquela sugerida pelo fabricante. Essa informação é crucial, pois a utilização de concentrações inadequadas de ingredientes pode afetar características sensoriais do produto final (Novello, Pollonio, 2015).

O potencial antimicrobiano para avaliar o controle *L. monocytogenes* dos ingredientes sintéticos também foi avaliado (Tabela 7 e 8). Os ingredientes sintéticos testados isoladamente, não apresentaram ação inibitória contra as cepas de *L. monocytogenes* avaliadas no estudo. O lactato de sódio, quando avaliado isoladamente, não exerceu ação inibitória sobre as cepas testadas, nem mesmo quando combinado em diferentes concentrações com o diacetato de sódio (Solução O).

Tabela 7. Ação inibitória (%) de aditivos antimicrobianos sintéticos isolados comerciais contra cepas de *L. monocytogenes*.

<i>L. monocytogenes</i>	Sal de cura	Sal	Lactato de sódio	Diacetato de sódio	<i>Blend</i> * comercial B
ATCC 15313	ND	ND	ND	ND	1,00
ATCC 19112	ND	ND	ND	ND	1,00
ATCC 19117	ND	ND	ND	ND	1,00
ATCC 7644	ND	ND	ND	ND	1,00
AM12-12	ND	ND	ND	ND	1,00 ^f
AM14-14	ND	ND	ND	ND	1,00 ^f

n = 3; ND: não detectado efeito antimicrobiano na faixa de concentração testada;

f: ação inibitória fraca/insuficiente;

(*) Lactato de sódio e acetato de sódio.

Tabela 8. Concentração inibitória (%) composta por soluções de antimicrobianos sintéticos comerciais contra cepas de *L. monocytogenes*.

<i>L. monocytogenes</i>	Solução						
	J	K	L	M	N	O	P
ATCC 15313	2,30	4,13	1,17	3,03	2,25	ND	1,50
ATCC 19112	2,30	4,13	1,17	3,03	2,25	ND	1,50
ATCC 19117	2,30	4,13	1,17	3,03	2,25	ND	1,50
ATCC 7644	2,30	4,13	1,17	3,03	2,25	ND	1,50
AM12-12	2,30	4,13	1,17	3,03	2,25	ND	1,50
AM14-14	2,30	4,13	1,17	3,03	2,25	ND	1,50

n = 3; ND: não detectado ação antimicrobiana na faixa de concentração testada;

f: ação inibitória fraca/insuficiente;

Solução J: sal de cura + lactato de sódio + diacetato de sódio + eritorbato de sódio;

Solução K: sal de cura + lactato de sódio + diacetato de sódio + eritorbato de sódio + sal;

Solução L: sal de cura + *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio) + eritorbato de sódio;

Solução M: sal de cura + *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio) + eritorbato de sódio + sal;

Solução N: sal de cura + lactato de sódio + diacetato de sódio;

Solução O: lactato de sódio + diacetato de sódio;

Solução P: sal de cura + *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio).

No entanto, o *blend* comercial B composto por lactato de sódio e o acetato de sódio a 1,00%, apresentou um efeito inibitório a 1,0 % sobre as cepas de referências testadas, porém as culturas selvagens foram mais resistentes a este composto. É possível verificar que a interação entre lactato de sódio e acetato de sódio tem efeito inibitório contra as cepas de *L. monocytogenes* testadas neste estudo.

Verificou-se que ao se adicionar sal de cura a uma concentração de 0,15%, em conjunto com lactato de sódio a 2,00% e diacetato de sódio a 0,10% (Solução N), bem como ao *blend* comercial B a 1,50% (Solução P), todas as cepas de *L. monocytogenes* testadas foram inibidas. No entanto, ao contrário dos tratamentos

naturais ao se adicionar 1,83% de sal nas formulações sintéticas (Soluções K e M), não foi observado efeito antagônico.

Após a avaliação da triagem, optou-se por prosseguir com as soluções que continha o *blend* comercial A e o *blend* comercial B. As soluções onde continham esses *blends* apresentaram efeitos desejados e estavam dentro dos limites fornecidos pelo fabricante. No caso do tratamento tradicional, embora não houvesse diferenças nas ações inibitórias entre as soluções com a presença do Sal de cura, o *blend* comercial B foi selecionado devido à sua maior disponibilidade comercial.

Os testes mostraram a capacidade de compostos naturais e sintéticos de inibir o crescimento da bactéria *L. monocytogenes*, constatando que ambos os conjuntos apresentaram propriedades antimicrobianas. Esses resultados têm implicações significativas na conservação de alimentos, oferecendo informações valiosas sobre as interações e a eficácia de diferentes ingredientes na inibição desse patógeno.

Entretanto, é crucial destacar as limitações do estudo, como o uso de um número limitado de cepas de *L. monocytogenes* e a realização dos testes em condições de laboratório. Essas condições podem não refletir fielmente o ambiente encontrado na produção em larga escala de alimentos. Fatores como a matriz do alimento, interações entre ingredientes e o produto, além de condições específicas de produção podem influenciar os resultados finais.

5.3. IMPACTO DO COZIMENTO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA LINGUIÇA CALABRESA COZIDA

O processo de cocção da linguiça calabresa nas duas repetições de processo apresentou o mesmo perfil de temperatura, como pode ser observado na Figura 4.

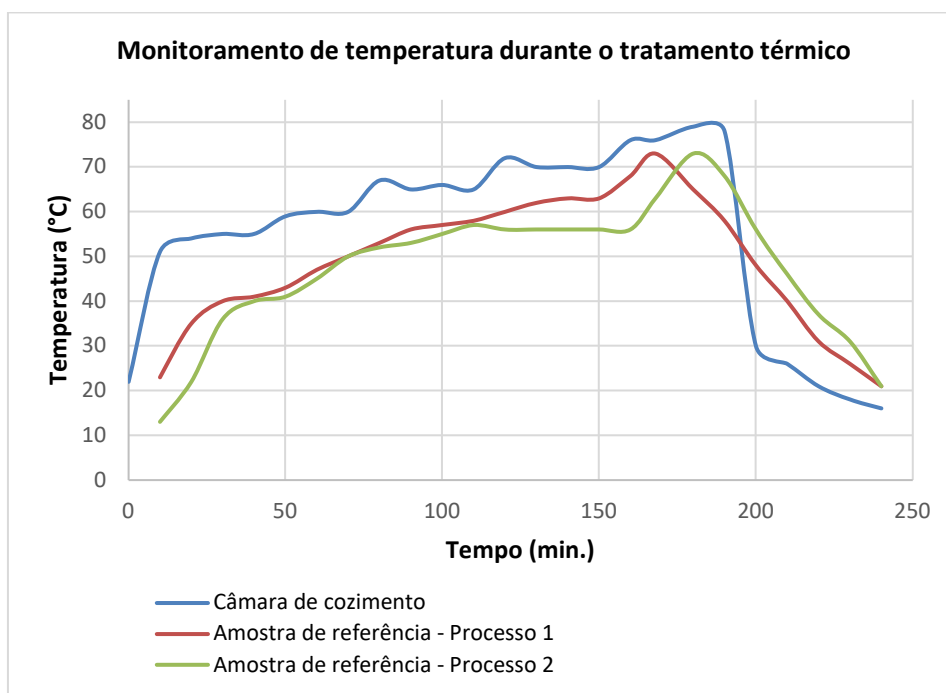


Figura 4. Curva de cozimento de linguiça calabresa pelo método escalonado de temperatura.

Observa-se que o tempo de cozimento é longo para que as proteínas imobilizem a água adicionada, reduzindo o risco de separação de gordura no produto final (Feiner, 2006). Devem-se evitar temperaturas excessivamente elevadas nos períodos em que a umidade relativa do ambiente é baixa, as temperaturas não devem ultrapassar 60°C, o que poderia comprometer a absorção da fumaça ou resultar na separação de gordura e água na camada superficial do produto (Puolanne, Halonen, 2010; Feiner, 2006). Durante a cocção a manutenção da temperatura máxima registrada no centro do produto a 72-74°C, favorece a gelatinização do colágeno. Além disso, essa faixa de temperatura é eficaz na destruição de patógenos como a *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. entre outras

células vegetativas de microrganismos patogênicos e deteriorantes (Puolanne, Halonen, 2010). Essa temperatura também contribui para estabilizar a cor resultante da cura. Temperaturas entre 65-68°C no centro do produto não são seguras do ponto de vista microbiológico. Geralmente, são recomendadas temperaturas mais altas para garantir a completa destruição de patógenos, a menos que o produto atinja 68°C e seja mantido nessa temperatura por um período prolongado, de pelo menos 20-25 min (Feiner, 2006).

Com o aumento da temperatura em baixas umidades relativas do meio, observa-se redução do teor de umidade do produto, enquanto os teores de gordura e proteína elevam-se proporcionalmente, o que indica que a maior parte da perda de peso durante o cozimento seja atribuída à remoção da água (Aaslyng et al. 2003). A perda de peso por cozimento da linguiça suína pode variar entre 10% e 35%, dependendo do regime de cocção (Del Pulgar, Gázquez, Ruiz-Carrascal, 2012; Aaslyng et al. 2003). No caso das linguiças calabresas cozida e analisadas neste estudo, observou-se uma variação de perda de peso média de aproximadamente 10% a 12% em todos os tratamentos em ambos os processos.

Nesse estudo, as formulações de linguiça calabresa cozida não foram adicionadas de fosfato. Como resultado da ausência do fosfato nos diferentes tratamentos, tradicional e alternativo, houve perda de estabilidade, pois foi observada migração da gordura para a superfície em ambos os processos.

A adição de fosfato em uma formulação é importante uma vez que este composto, auxilia no aumento da suculência, reduz forças de cisalhamento assim como perdas por exsudação e migração da gordura durante o cozimento (Long, Gál, Buňka, 2011; Feiner, 2006). Além disso, os fosfatos desempenham um papel importante na estabilização do pH, prevenindo a descoloração, além de fornecer propriedades antioxidantes (Long, Gál, Buňka, 2011). Nos produtos cárneos, os fosfatos atuam com o cloreto de sódio favorecendo a extração e a solubilização das proteínas miofibrilares, essenciais para a capacidade de retenção de água do produto e emulsificação da gordura, melhorando assim a textura e a suculência. Além disso, previnem a oxidação lipídica e melhoram a maciez e a qualidade sensorial (Feiner, 2006; Long, Gál, Buňka, 2011; Pinton et al. 2021).

As análises físico-químicas foram conduzidas 24 h após os processamentos (A-B), visando determinar as características físico-químicas e

microbiológicas das linguças íntegras antes do fatiamento. Foi observada uma diferença significativa ($p < 0,05$) na repetição do processamento em relação aos teores de gordura, proteína e nitrito Tabela 9. Apesar da diferença significativa no teor de umidade entre os processamentos, essa diferença não seria considerada relevante sob um ponto de vista prático.

Tabela 9. Caracterização físico-química da linguça calabresa íntegra 24 h $\pm$ 1 h após o processamento.

Processo	Tratamentos			
	Primeiro		Segundo	
	Tradicional	Alternativo	Tradicional	Alternativo
Cinzas (g/100g)	3,00 $\pm$ 0,01 ^{aA}	4,13 $\pm$ 0,01 ^{aB}	3,08 $\pm$ 0,00 ^{aA}	4,21 $\pm$ 0,01 ^{aB}
Gordura (g/100g)	21,07 $\pm$ 0,11 ^{aA}	20,38 $\pm$ 0,20 ^{aA}	15,69 $\pm$ 0,13 ^{bA}	16,11 $\pm$ 0,00 ^{bA}
Proteína (g/100g)	17,55 $\pm$ 0,01 ^{aA}	15,83 $\pm$ 0,01 ^{aB}	19,99 $\pm$ 0,03 ^{bA}	20,10 $\pm$ 0,02 ^{bB}
Umidade (g/100g)	58,66 $\pm$ 0,17 ^{aA}	60,19 $\pm$ 0,08 ^{aB}	61,63 $\pm$ 0,10 ^{bA}	63,20 $\pm$ 0,08 ^{bB}
Nitrito (mg/Kg)	78,03 $\pm$ 0,19 ^{aA}	59,95 $\pm$ 0,14 ^{aB}	21,77 $\pm$ 0,27 ^{bA}	40,77 $\pm$ 0,11 ^{bB}
Nitrato (mg/Kg)	15,03 $\pm$ 1,45 ^{aA}	33,40 $\pm$ 0,74 ^{aB}	29,80 $\pm$ 0,29 ^{aA}	16,20 $\pm$ 1,10 ^{aB}
pH	6,09 $\pm$ 0,00 ^{aA}	5,79 $\pm$ 0,00 ^{aB}	5,96 $\pm$ 0,00 ^{aA}	5,74 $\pm$ 0,01 ^{aB}
Atividade de água	0,970 $\pm$ 0,00 ^{aA}	0,955 $\pm$ 0,00 ^{aB}	0,977 $\pm$ 0,00 ^{aA}	0,961 $\pm$ 0,00 ^{aB}

Médias na mesma linha, seguidas por letras minúsculas sobrescritas distintas, diferem entre repetição de processos pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Médias na mesma linha, seguidas por letras maiúsculas sobrescritas distintas, diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

A variação nas características físico-químicas das linguças calabresas pode ser atribuída às variações de teor de gordura e umidade das matérias-primas, carga de produto na estufa e variações de umidade relativa durante o processo térmico em estufa, impactando os teores finais de gordura e proteína, bem como à variabilidade inerente ao produto (Aaslyng et al. 2003). Fatores como a alimentação do animal, genética, manejo, tipo de corte e preparo também desempenham um papel significativo na determinação do teor de gordura e outras características na carne (Da Silva et al. 2018; Geletu et al. 2021). Os resultados indicados na tabela 9 das linguças calabresas, indicaram que estas diferenças podem ser atribuídas às propriedades intrínsecas da carne, aliadas ao tratamento térmico aplicado em cada experimento, pois, o processo de cocção exerce uma influência direta nas características físico-químicas finais do produto (Pinheiro et al. 2008; Barbanti, Mucchett, 2010).

No segundo processo, embora o perfil de temperatura do produto não tenha diferido significativamente em comparação com o primeiro processo, como demonstrado na Figura 4, a umidade relativa na estufa foi inferior àquela atribuída ao primeiro processo. Essa diferença nas condições térmicas pode ter influenciado significativamente as características finais das linguiças calabresas, enfatizando não apenas a importância da temperatura, mas também das condições de umidade durante o tratamento térmico.

Em um estudo que avaliou a qualidade físico-química da linguiça colonial comercializada, foi possível evidenciar variações nessas características entre diferentes produtores. Por exemplo, nos índices de umidade, gordura e proteína, observou-se uma considerável variação, destacando a influência de diversas práticas de produção. A variação no índice de umidade foi de 51% a 62% entre os produtos, enquanto o índice de gordura apresentou percentuais mínimos de 11% e máximos de 23% no mesmo tipo de produto entre diferentes fabricantes. Essa variabilidade também foi notada em estudos que avaliaram linguiça toscana em vários supermercados (Bezerra et al. 2012; Baretta et al. 2018).

Quando consideramos diferenças entre os tratamentos, observamos distintas variações significativas ($p < 0,05$) nos teores de cinzas, proteínas, umidade, nitrito, nitrato, pH e atividade de água, com similaridade apenas no teor de gordura.

No que diz respeito aos valores de pH, notamos que o tratamento alternativo exibiu níveis de acidez superiores em comparação aos tratamentos tradicionais, conforme detalhado na Tabela 9, independente da repetição de processo. Essa elevação no pH pode ser atribuída à presença da acerola em pó, rico em vitamina C (ácido ascórbico), que possui um potencial de reduzir o pH do produto cárneo devido à sua natureza ácida (da Nóbrega Santos, 2020). Além disso, a adição de vinagre também pode ter influenciado na diminuição do pH, uma vez que o ácido acético presente no vinagre, ao ser adicionado a um sistema alimentício, dissocia-se, auxiliando na regulação do pH do alimento e impactando positivamente no valor de atividade de água, também devido às suas propriedades ácidas (SEBRAE, 2013; Sarker et al. 2021). Essas alterações nas formulações podem modificar as condições de processamento e as reações químicas, o que, por conseguinte, pode

ter implicações na funcionalidade das proteínas. Além disso, o tipo de tratamento térmico empregado também pode exercer influência nesse aspecto. Outra diferença significativa entre os tratamentos é observada no teor de cinzas. A inclusão de extratos de aipo e acerola, conhecidos pela sua riqueza mineral, pode exercer influência sobre o conteúdo de cinzas do produto (Awad et al. 2022; Zhou, Wang, Wang, 2020; Kim et al. 2019; Riel et al. 2017; Correia et al. 2010). O valor de cinzas, como indicador do conteúdo mineral global presente no alimento, pode ser notavelmente influenciado pela adição desses extratos.

5.4. MONITORAMENTO DO PH E ATIVIDADE DE ÁGUA DURANTE 75 DIAS DE ARMAZENAMENTO DAS LINGUIÇAS FATIADAS.

Os valores mensurados estão apresentados na Tabela 10. Os valores de pH e atividade de água são indicadores importantes da acidez e da disponibilidade de água no produto, respectivamente, e podem afetar o crescimento microbiano e a segurança dos alimentos (Franco, 2008). O monitoramento dessas características ao longo do tempo é crucial para avaliar a estabilidade e a qualidade dos produtos durante o armazenamento, os níveis de pH que se aproximam da neutralidade são extremamente favoráveis à multiplicação microbiana (USGS, 2019; Saleh et al. 2017; FOOD SAFETY, 2001; Dams, 2023). A relevância do pH do produto é dupla: ele não só regula a microbiota que pode colonizar o produto, influenciando diretamente sua preservação, mas também está correlacionado com a cor e o sabor que da linguiça cozida (Almeida, 2005; Dams, 2023).

Tabela 10. Valores de pH e atividade de água das amostras de linguiça calabresa cozida fatiada analisadas durante 75 dias para diferentes formulações no primeiro processo.

Tempo (dias)	Tradicional		Alternativo	
	pH	Aa*	pH	Aa
15	6,12±0,00 ^{aA}	0,969±0,00 ^{abA}	5,82±0,00 ^{dcB}	0,956±0,00 ^{cB}
30	6,13±0,01 ^{aA}	0,968±0,00 ^{bA}	5,84±0,01 ^{cB}	0,955±0,00 ^{cdB}
45	6,06±0,01 ^{bA}	0,971±0,00 ^{aA}	5,82±0,00 ^{dcB}	0,956±0,00 ^{cdB}
60	6,12±0,01 ^{aA}	0,969±0,00 ^{abA}	5,78±0,01 ^{eB}	0,955±0,00 ^{cdB}
75	6,09±0,00 ^{bA}	0,969±0,00 ^{abA}	5,80±0,00 ^{deB}	0,954±0,00 ^{dB}

(*) Atividade de água; média na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas sobrescritas distintas, diferem entre dia e tratamento pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Médias na mesma linha, seguidas por letras maiúsculas sobrescritas distintas, diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Tradicional: sal de cura, eritorbato de sódio e *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio); alternativo extrato de aipo, acerola em pó e *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada); controle: sem adição de fonte de nitrito, antioxidante e antimicrobiano.

No primeiro processo nas amostras que receberam o tratamento tradicional, o pH manteve-se relativamente estável ao longo do tempo, variando ligeiramente entre 6,06 e 6,13. No tratamento alternativo, o pH das amostras também permaneceu estável, oscilando entre 5,78 e 5,84, conforme registrado na tabela 10, apresentando diferença significativa entre eles ($p < 0,05$). A análise desses dados sugere que o tratamento alternativo tende a resultar em um pH ligeiramente mais baixo em comparação com o tratamento tradicional, devido ao uso de vinagre.

Ao analisar o tempo de estocagem durante a vida útil, observou-se ligeira variação nos valores de pH ao longo do tratamento. No tratamento tradicional, o valor de pH das amostras permaneceu estável até 30 dias, apresentando uma oscilação a partir dos 45 dias, quando então houve uma redução de 0,01 unidade, retornando aos níveis iniciais aos 60 dias, seguida de uma nova redução de 0,003 aos 75 dias de armazenamento, resultando em uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Isso sugere estabilidade do produto durante o período de armazenamento. No tratamento alternativo, houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos de 15 dias e 75 dias, enquanto o pH permaneceu estável durante o restante do armazenamento. Apesar das diferenças estatísticas em ambos os tratamentos, essa variação não teria impacto prático.

Não houve efeito do tempo nos valores de pH e atividade de água; por outro lado, observou-se um efeito significativo do tratamento utilizado. No segundo

processo descrito na Tabela 11, no tratamento tradicional, o valor de pH das amostras variou entre 5,86 e 5,94, enquanto o pH das amostras submetidas ao tratamento alternativo, o pH parece diminuir ligeiramente ao longo do tempo, de 5,76 para 5,71, antes de aumentar novamente para 5,76, essas variações no pH não teriam implicações significativas para o crescimento microbiano.

Tabela 11. Médias dos valores de pH e atividade de água da linguiça calabresa cozida fatiada analisadas ao longo de um período de 75 dias para diferentes formulações no segundo processo.

Tempo (dias)	Tradicional		Alternativo	
	pH	Aa*	pH	Aa
15	5,91±0,00 ^{bA}	0,956±0,00 ^{bA}	5,76±0,01 ^{eB}	0,938±0,00 ^{dB}
30	5,94±0,01 ^{aA}	0,957±0,00 ^{aA}	5,81±0,01 ^{dB}	0,941±0,00 ^{cB}
45	5,86±0,00 ^{cA}	0,956±0,00 ^{aA}	5,71±0,00 ^{fB}	0,943±0,00 ^{cB}
60	5,94±0,00 ^{aA}	0,954±0,00 ^{bA}	5,74±0,01 ^{eB}	0,946±0,00 ^{cB}
75	5,87±0,00 ^{cA}	0,956±0,00 ^{abA}	5,76±0,00 ^{eB}	0,938±0,00 ^{dB}

(*) Atividade de água; média na mesma coluna, seguidas por letras minúsculas sobrescritas distintas, diferem entre dia e tratamento pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Médias na mesma linha, seguidas por letras maiúsculas sobrescritas distintas, diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. Tradicional: sal de cura, eritorbato de sódio e *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio); alternativo extrato de alpo, acerola em pó e *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada); controle: sem adição de fonte de nitrito, antioxidante e antimicrobiano.

A atividade de água é um fator crítico na segurança e qualidade dos alimentos, como mencionado anteriormente, influenciando a estabilidade, vida útil e segurança dos produtos alimentícios. Os resultados descritos na Tabela 11 revelam diferenças significativas ($p < 0,05$) no comportamento das amostras em relação aos valores de atividade de água, conforme o tratamento aplicado. Observou-se que a atividade de água da linguiça calabresa cozida fatiada no tratamento tradicional apresentou variação de 0,968 a 0,971, enquanto as amostras do tratamento alternativo variaram de 0,954 a 0,956, mantendo-se estável.

No segundo processo, é perceptível uma redução na atividade de água em ambos os tratamentos, quando comparamos a linguiça inteira com a linguiça fatiada no 15º dia de armazenamento. Esta diminuição sugere que a redução da atividade de água seria resultante da evaporação da água superficial das linguiças. Mesmo sendo inferior em relação ao primeiro processo, a atividade de água se manteve constante ao longo do armazenamento em ambos os tratamentos. Embora existam

diferenças entre o primeiro processo e o segundo processo, tanto em relação ao pH quanto à atividade de água, as amostras do tratamento alternativo mantiveram valores mais baixos em comparação com o tratamento tradicional.

Os dados obtidos apontam que as formulações alternativas podem afetar as propriedades de pH e atividade de água da linguiça calabresa cozida e fatiada, aspectos que podem ser cruciais para a qualidade e segurança do produto durante sua vida útil. Levando em conta que níveis mais reduzidos de atividade de água e pH são geralmente menos propícios para o desenvolvimento microbiano (Feldes, 2022), isso sugere que o tratamento alternativo pode ser potencialmente mais eficiente na inibição do crescimento de microrganismos. Adicionalmente, observou-se em todos os tratamentos e em ambos os processos uma relação direta entre o pH e a atividade de água, indicando que quanto maior o pH, maior a atividade de água.

5.5. MONITORAMENTO DOS TEORES DE NITRITO E NITRATO DAS AMOSTRAS DE LINGUIÇA CALABRESA COZIDA E FATIADA DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.

A Figura 5 exibem os teores de nitrito e nitrato das linguiças calabresas cozidas e fatiadas, as quais foram armazenadas por um período de 75 dias a $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$. O propósito da avaliação dos níveis de nitrito e nitrato ao longo do período de armazenamento das linguiças fatiadas e refrigeradas foi verificar a variação desses teores ao longo do armazenamento e compreender como as condições às quais as amostras foram submetidas poderiam influenciar esses produtos com diferentes formulações.

Apesar da formulação tradicional não incluir a adição de nitratos, foi identificada a presença desse composto em amostras provenientes de ambos os processos (primeiro e segundo), com teores médios de nitratos de aproximadamente 4,62 mg de NaNO_3/kg no primeiro processo e 15,85 mg de NaNO_3/kg no segundo processo, antes do cozimento do produto.

Após a adição das fontes de nitrito no primeiro processo, os teores de nitrito foram analisados, resultando em 129,19 mg/kg nas massas do tratamento tradicional e 180,89 mg/kg no alternativo. Após o cozimento, observou-se uma redução de 39,6% nas amostras do tratamento tradicional e de 66,9% no

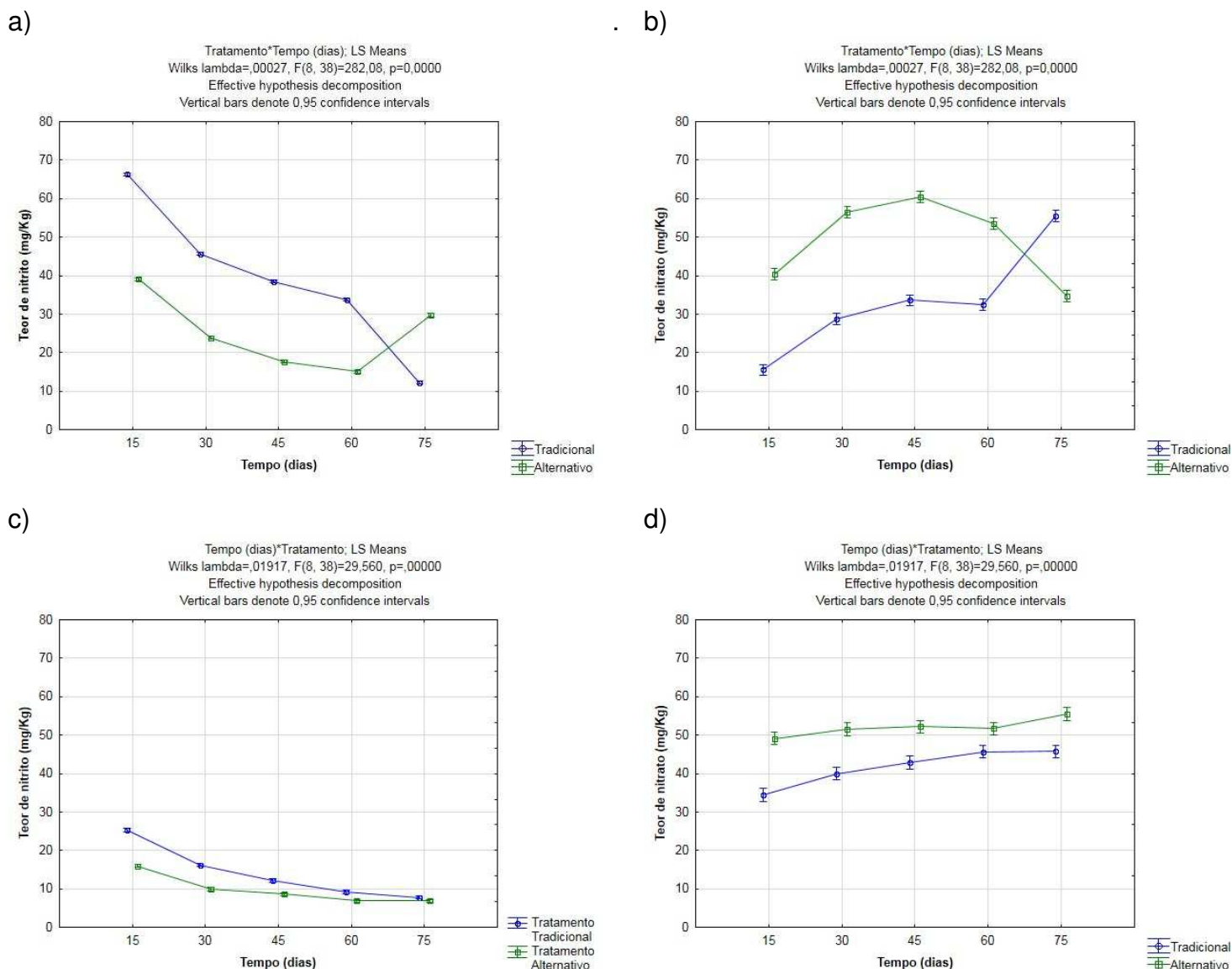
tratamento alternativo nos teores de nitrito. Essa redução pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo reações químicas durante o cozimento e possíveis interações com outros componentes da matriz alimentar.

Observou-se que todas as amostras apresentaram teor médio de nitrito de $68,99 \pm 9,90$ mg/Kg 24h após o cozimento, estando, portanto, dentro do limite máximo permitido pela legislação brasileira em vigor, que é de 150 mg/Kg.

Verificou-se que o tempo de armazenamento exerceu efeito significativo ($p < 0,05$) sobre o teor de nitrito das amostras de linguiça calabresa fatiada, em ambos os tratamentos (Figura 5).

De forma geral, o teor de nitrito residual no tratamento alternativo permaneceu menor e reduzindo até os 60 dias de armazenamento. Somente no dia 75, essa situação se inverteu, quando então as amostras provenientes do tratamento tradicional apresentaram um teor mais reduzidos de nitrito. Consequentemente, o teor de nitrato, que permanecia maior no tratamento alternativo, aos 60 dias foi ultrapassado pelo tratamento tradicional, sugerindo uma conversão do nitrato presente em nitrito.

A redução do nitrato (NO_3^-) para nitrito (NO_2^-) pode ser realizada por bactérias redutoras de nitrato, que possuem a enzima nitrato redutase (González, 2006; Hammes, 2012). Essa redução do nitrato a nitrito pode ocorrer em condições anaeróbicas, onde o nitrato é usado como um aceptor de elétrons em vez de oxigênio (Majou, Christieans, 2018). Esse comportamento é influenciado pelo pH e temperatura do meio, especialmente durante o armazenamento do produto (Honikel, 2008).



a) Valor médio do teor residual de nitrito, primeiro processo; b) Valor médio do teor residual de nitrato primeiro processo. c) Valor médio do teor residual de nitrito, segundo processo; d) Valor médio do teor residual de nitrato segundo processo.

Figura 5 – Teores de nitrito e nitrato em amostras em linguiça calabresa fatiada embalada a vácuo durante armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ por 75 dias – Primeiro processo e segundo processo.

Quando examinados os teores de nitrito no segundo processo, constatou-se que as concentrações adicionadas foram de 139,66 mg/kg no tratamento tradicional e 134,84 mg/kg no alternativo. Após o processo de cocção, foi observada uma redução significativa nos teores de nitrito, alcançando 70,8% no tratamento tradicional e 83,9% no alternativo. É interessante notar que apesar do método de

cocção empregado nesse processo redução pós-cocção no tratamento alternativo permaneceu superior em ambos os processos.

No segundo processo, analisando os dados da Figura 5, observou-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) para os valores de nitrato residual entre os dias de estocagem das amostras fatiadas do tratamento alternativo 15 aos 75 dias. O mesmo ocorreu no tratamento tradicional a partir de 30 dias até o final do acompanhamento da vida útil.

Quanto ao teor residual de nitrito de sódio das formulações, em relação aos tratamentos, o nitrito residual foi detectado em ambas as formulações apresentando concentrações menores no segundo processo em ambos os tratamentos.

Os resultados das análises dos teores de nitrato e nitrito residual para ambas as amostras avaliadas em ambos os processos indicam que as concentrações obtidas estão em conformidade com os padrões estabelecidos pela legislação, os quais são de 300 mg/kg para o nitrato e 150 mg/kg para o nitrito (BRASIL, 2019).

5.6. CRESCIMENTO DE *L. monocytogenes* E BACTÉRIAS LÁCTICAS EM LINGUIÇA CALABRESA COZIDA ADICIONADA DE DIFERENTES ANTIMICROBIANOS.

Após 24 h do processamento de cada lote de linguiça calabresa cozida, realizou-se a caracterização microbiológica do produto íntegro (não fatiado), visando avaliar sua conformidade com os padrões microbiológicos (IN 161, 2022) (Tabela 12), incluindo-se as contagens de bactérias lácticas.

Tabela 12. Caracterização microbiológica de linguiça calabresa cozidas recém produzidas com os padrões microbiológicos 24 h após o tratamento térmico.

Processo	Tratamentos					
	Tradicional		Alternativo		Controle	
	Primeiro	Segundo	Primeiro	Segundo	Primeiro	Segundo
<i>Listeria monocytogenes</i> (log UFC/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Bactérias lácticas (log UFC/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
<i>Clostridium perfringens</i> (log UFC/g)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
Estafilococos coagulase positiva (log UFC/g)	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0	<2,0
<i>Salmonella spp.</i> (ausência em 25 g)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

UFC – Unidade formadora de colônia

Tradicional: sal de cura, eritorbato de sódio e *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio); alternativo extrato de aipo, acerola em pó e *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada); controle: sem adição de fonte de nitrito, antioxidante e antimicrobiano.

Para a avaliação do potencial antimicrobiano dos aditivos naturais e tradicionais na vida útil do produto fatiado inoculado com *L. monocytogenes* foram preparados dois processos distintos (primeiro e segundo) e testadas duas concentrações de inóculo: (2,0 e 4,0 log UFC/g).

O *pool* de cepas foi inoculado no produto já fatiado, representando a contaminação pós-processo pois a *L. monocytogenes* pode se dissemina nos ambientes onde o produto é manipulado. Esse *pool* inclui tantas cepas de referência, para garantir a qualidade do experimento, quanto cepas selvagens isoladas de produtos cárneos. Esse procedimento visa compreender a diversidade e ecologia do microrganismo, conforme recomendado pelo método adotado. A inclusão de cepas isoladas do mesmo alimento, ou de um alimento semelhante ao que está sendo testado, é crucial. Pesquisas recentes demonstram que há diferenças significativas em nível de subespécies e em diferentes nichos, com isolados exibindo variações no potencial patogênico e de virulência (Gray et al. 2004; Maury et al. 2016; Gmeiner et al. 2024).

As cepas selvagens podem demonstrar maior capacidade de adaptação e crescimento na matriz do alimento em comparação com as cepas de referência. Essa diversidade de isolados se assemelha as condições reais encontradas no ambiente alimentar e contribui para resultados mais representativos e aplicáveis (Spanu, et al. 2014).

As contagens de *L. monocytogenes* nas amostras de linguiça calabresa cozida fatiada inoculadas com 2,0 log UFC/g referente aos tratamentos tradicional e alternativos e armazenadas a 4°C por 75 dias provenientes dos dois processamentos realizados (primeiro e segundo) estão apresentadas na Figura 6. Não foi detectada *L. monocytogenes* nas amostras sem adição de inóculo nos tratamentos avaliados (controle negativo) durante o período avaliado. Conforme esperados as amostras do controle positivo, nas quais não houve adição de agentes antimicrobianos, apresentou um aumento de crescimento constante ao longo do tempo, atingindo $8,48 \pm 0,09$ log UFC/g 75º dia (Figura 6).

O valor médio das contagens de *L. monocytogenes* nas amostras recém inoculadas foi $1,98 \pm 0,09$ log UFC/g. Esse resultado indica que o processo de adesão atingiu efetivamente o estabelecido em todos os tratamentos, contribuindo para a precisão e eficiência do protocolo experimental.

O estudo comparativo entre as amostras provenientes do tratamento tradicional e alternativo revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) em termos de capacidade de inibição do crescimento de *L. monocytogenes* (Tabela 13). Enquanto o tratamento tradicional demonstrou uma capacidade de inibição de relativamente baixo, o tratamento alternativo apresentou uma alta capacidade ao longo do período do armazenamento reduzindo 0,76 log UFC/g. Isso é evidente em todas as análises realizadas ao longo do tempo (15, 30, 45, 60 e 75 dias), que mostraram contagens inferiores nas amostras tratadas com aditivos alternativos.

Tabela 13. Inibição de *L. monocytogenes* (inóculo 2 log UFC/g) linguiça calabresa fatiados com antimicrobianos e antioxidantes alternativo-tradicionais e armazenadas a 4±1°C durante 75 dias.

	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g)					
	Tempo (dia)					
	1	15	30	45	60	75
Primeiro processo						
Controle	1,94±0,58	3,45±0,45	7,00±0,17	8,26±0,03	8,25±0,22	8,48±0,09
Tradicional	2,04±0,75	2,48±0,77	4,41±0,21	6,55±0,22	7,75±0,14	7,96±0,12
Alternativo	1,96±0,63	1,40±0,35	2,00±0,00	1,20±0,35	1,00±0,00	1,20±0,35
Segundo processo						
Controle	1,90±0,17	2,63±0,06	4,64±0,50	6,30±0,07	7,02±0,15	7,63±0,34
Tradicional	1,97±0,55	1,66±0,10	1,58±0,53	1,60±0,00	1,20±0,35	1,40±0,35
Alternativo	1,99±0,53	1,60±0,00	1,87±0,46	1,20±0,35	1,20±0,35	1,00±0,00

Valores médios expressos em log UFC/g ± Desvio padrão. Tradicional: sal de cura, eritorbato de sódio e *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio); alternativo extrato de aipo, acerola em pó e *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada); controle: sem adição de fonte de nitrito, antioxidante e antimicrobiano.

Esses resultados ressaltam a eficácia do tratamento Alternativo na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* em linguiça calabresa fatiada, sugerindo sua viabilidade como uma estratégia de controle eficaz contra esse patógeno.

É importante mencionar que a análise da atividade de água e pH contribuiu para a compreensão dos resultados. No tratamento Tradicional, a atividade de água manteve-se próxima a 0,969, com pH de 6,10. Já no tratamento Alternativo, a atividade de água foi de 0,955, e pH de 5,80. Essas condições ambientais desempenharam um papel significativo na modulação do crescimento de *L. monocytogenes*, ressaltando a interdependência complexa entre fatores ambientais e microbiológicos.

As contagens de bactérias lácticas (Figura 6) no tempo zero para todos os tratamentos foram inferiores aos níveis detectáveis por plaqueamento direto (<1 log UFC/g). Aos 45 d, as contagens aumentaram para 1,65 ± 1,13 log UFC/g para as amostras do tratamento tradicional apresentando diferenças significativas (p < 0,05) durante o armazenamento, atingindo 7,56± 0,09 log ao final dos 75 dias de armazenamento.

Ao correlacionar esses dados, pode-se observar se há uma relação entre o crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas. Em outras palavras, períodos em que as bactérias lácticas apresentam um crescimento mais acentuado podem estar associados a uma menor contagem de *L. monocytogenes*, e vice-versa.

Ao analisar o segundo processo no tratamento tradicional, que exibiu valores mais baixos de atividade de água e pH - 0,955 e 5,90, respectivamente, em comparação com o primeiro processo, foi observado um crescimento mais contido (ver Figura 6). Apesar do crescimento no tratamento alternativo permanecer inferior ao tradicional (Tabela 14), não teve diferença significativa ($p = <0,05$).

A relação entre o pH e atividade de água e o crescimento bacteriano destaca a importância do controle das características desse produto como estratégia para preservar a segurança do produto. Além disso, foi identificada uma correlação entre a atividade de água e o crescimento de *L. monocytogenes* em todos os tratamentos, indicando que níveis mais elevados de atividade de água estão associados a contagens bacterianas mais altas.

No segundo processo, observamos uma tendência semelhante, onde o tratamento Alternativo também apresentou uma capacidade maior de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em comparação ao Tratamento Tradicional. Novamente, as contagens de UFC/g foram consistentemente menores para o tratamento Alternativo ao longo do período analisado, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = <0,05$). Esses resultados destacam a influência não apenas dos antimicrobianos, mas também das características físico-químicas no crescimento desse patógeno.

Quando avaliamos o crescimento de bactérias lácticas existe uma variação ao longo do tempo, destacando diferentes padrões nos tratamentos. No tratamento tradicional, nota-se um aumento significativo aos 15 dias, enquanto o tratamento alternativo mantém um crescimento mais contido. É possível verificar que, de maneira geral, à medida que a contagem de bactérias lácticas aumenta, a contagem de *L. monocytogenes* tende a diminuir.

Além da competição e da acidez, outras interações potenciais, como a produção de substâncias antimicrobianas pelas bactérias lácticas, podem estar contribuindo para a inibição do crescimento de *L. monocytogenes*, em ambos os processos, especialmente no tratamento Alternativo. Em geral, à medida que o pH aumenta, o crescimento de bactérias lácticas tende a diminuir. Isso é consistente com a compreensão de que bactérias lácticas muitas vezes preferem ambientes mais ácidos.

Quando comparamos os dois tratamentos com a atividade de água 0,955, o Tradicional (Segundo processo) e o Alternativo (Primeiro processo), foi possível observar que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o crescimento de *L. monocytogenes*. Ambos os processos demonstram consistentemente que o tratamento Alternativo tem um potencial na inibição do crescimento de *L. monocytogenes*.

Apesar de o primeiro processo no tratamento tradicional não ter inibido o crescimento de *L. monocytogenes*, quando avaliados em condições com pH e atividade de água mais baixos, obteve-se resultados satisfatórios.

Estudos já demonstraram que vinagre e a dextrose fermentada apresentam eficácia não apenas na redução da carga microbiana, mas também na melhoria da textura de produtos cárneos durante o armazenamento refrigerado. Essa sinergia entre os componentes pode resultar em efeitos benéficos tanto para a segurança alimentar quanto para a qualidade sensorial desses produtos (Park, Hong, Yoon, 2014). Há evidências de que a combinações similares ao Blend comercial A demonstram efeitos positivos não apenas contra *L. monocytogenes*, mas também em outros microrganismos patogênicos, como *Campylobacter jejuni* e *Salmonella Typhimurium*, em peito de frango (Park, Hong, Yoon, 2014). Além disso, estudos adicionais, como o de McDonnell, Glass e Sindelar (2013), confirmaram a eficácia dessa combinação na inibição de *L. monocytogenes* em diversos produtos, como peru, rosbife e presunto desossado.

Quando os tratamentos foram inoculados a uma concentração de 4 log UFC/g, em ambos processos (primeiro e segundo), pode-se verificar que o comportamento similar ao observado com a concentração mais reduzida (2 log UFC/g).

No segundo processo, conforme descrito na Tabela 14, pode-se observar que, no tratamento sem antimicrobiano (controle), foi atingida contagem de $7,52 \pm 0,05$ log UFC/g aos 45 dias de armazenamento, apresentando um crescimento constante. Em contraste, as amostras não inoculadas permaneceram estáveis durante o período avaliado, sem apresentar crescimento detectável de *L. monocytogenes*.

Tabela 14. Inibição de *L. monocytogenes* (inóculo 4 log UFC/g) linguiça calabresa fatiados com antimicrobianos e antioxidantes alternativo-tradicionais e armazenadas a 4±1°C durante 75 dias.

	Contagens de <i>L. monocytogenes</i> (log UFC/g)					
	Tempo (dia)					
	1	15	30	45	60	75
Primeiro processo						
Controle	4,67±0,04	6,88±0,54	7,49±0,13	7,29±0,63	7,74±0,09	7,74±0,05
Tradicional	4,29±0,15	4,63±0,47	6,09±0,53	7,42±0,16	7,69±0,26	7,63±0,16
Alternativo	4,17±0,15	4,26±0,49	3,66±0,10	3,16±0,02	3,04±0,07	2,95±0,05
Segundo processo						
Controle	5,18±0,06	5,51±0,27	6,44±1,32	7,52±0,38	7,34±0,07	8,19±0,16
Tradicional	4,63±0,48	4,75±0,08	4,33±0,63	4,24±0,56	5,18±0,74	4,21±0,04
Alternativo	4,87±0,05	4,58±0,06	4,12±0,07	3,80±0,27	3,93±0,20	3,50±0,12

Valores médios expressos em log UFC/g ± Desvio padrão.
 Tradicional: sal de cura, eritorbato de sódio e *blend* comercial B (lactato de sódio e acetato de sódio); alternativo extrato de aipo, acerola em pó e *blend* comercial A (vinagre em pó e dextrose fermentada); controle: sem adição de fonte de nitrito, antioxidante e antimicrobiano.

No primeiro processo, nas amostras do tratamento tradicional, as contagens aumentaram progressivamente, nos dias 45, 60 e 75, apresentando um comportamento similar ao observado no primeiro processo, onde o inóculo foi em menor concentração. Essa tendência de aumento contínuo sugere que o tratamento tradicional pode não ser tão eficaz na contenção do crescimento de *L. monocytogenes* quando exposto a uma concentração maior de inóculo durante o armazenamento, especialmente com uma atividade de água de 0,969, como foi o caso do primeiro processamento.

A presença de níveis mais elevados de bactérias lácticas (Figura 6) pode estar relacionada ao crescimento mais acentuado observado de *L. monocytogenes*, especialmente nos dias 45, 60 e 75. Isso ocorre porque as bactérias lácticas têm a capacidade de produzir uma grande variedade de compostos antimicrobianos que podem afetar não apenas o seu próprio crescimento, mas também o crescimento de cepas de *L. monocytogenes* (Dias, 2021).

Diferentemente do observado no tratamento tradicional, o tratamento alternativo demonstrou um comportamento mais controlado, com contagens consistentemente baixas ao longo dos 75 dias. A contagem de *L. monocytogenes* apresentou uma diminuição a partir do dia 30, reduzindo aproximadamente 1,22 log no dia 75. A leve redução no pH e a constância na atividade de água também pode ter contribuído para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* Figura 6.

É evidente a eficácia do tratamento alternativo em conter o crescimento de *L. monocytogenes*, pois, contagens baixas se manteve mesmo em períodos mais longos de armazenamento. Contagem baixa de bactérias lácticas no tratamento alternativo sugere que essas bactérias podem não ter desempenhado um papel significativo na competição com *L. monocytogenes*. A efetividade observada pode estar relacionada a outros fatores presentes nesse tratamento, indicando uma possível inibição do crescimento dessas bactérias.

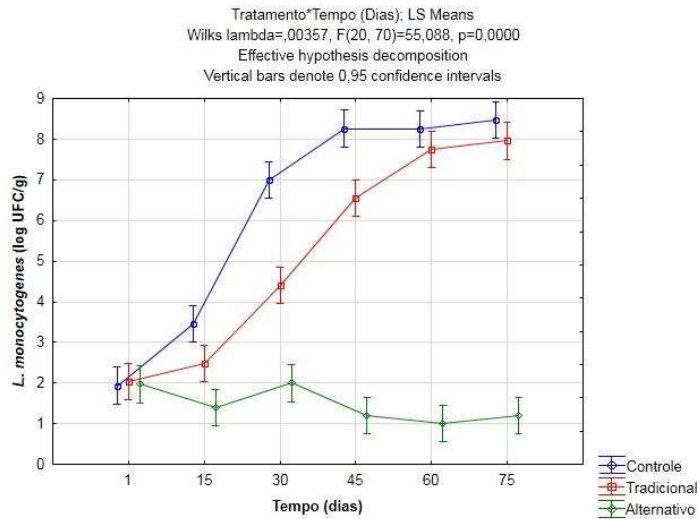
No estudo do segundo processo, tradicional e alternativo, utilizando linguiça cozida fatiada com atividade de água de 0,955, observou-se que o crescimento de *L. monocytogenes* foi contido em ambos os tratamentos, sugerindo que a atividade de água tem um impacto relevante nesta categoria de produto.

No entanto, ambos tratamentos demonstraram um potencial de redução conforme ilustrado na Figura 6. No tratamento alternativo, o crescimento de *L. monocytogenes* diminui à medida que o tempo avança, enquanto as contagens de bactérias lácticas aumentam ao longo do armazenamento. Nesse caso, sugere que as bactérias lácticas podem estar inibindo o crescimento de *L. monocytogenes* neste tratamento. É notável que, o tratamento tradicional, demonstrou um potencial de crescimento a partir do dia 45.

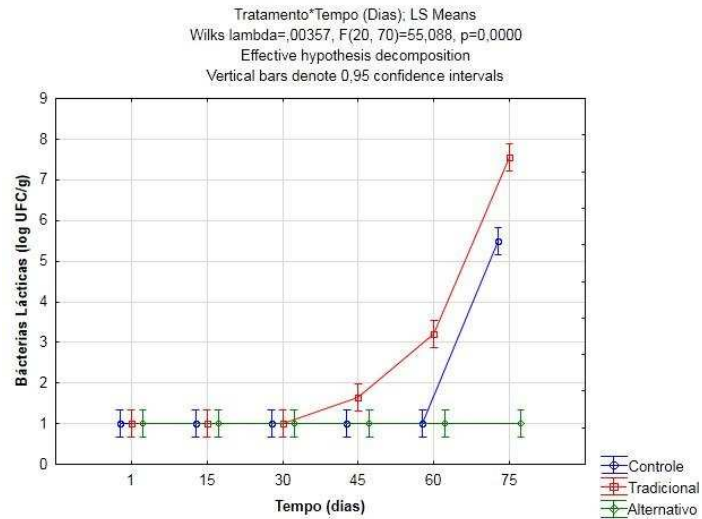
O crescimento de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas parecem ser relativamente estáveis ao longo do tempo. À medida que o tempo avançava, notou-se um aumento nas contagens de bactérias lácticas em todos os tratamentos, atingindo o pico em torno do 45º d. Durante esse período, o tratamento Tradicional apresentou contagens mais elevadas de bactérias lácticas em comparação com o Alternativo. Isso pode indicar que as bactérias lácticas não têm um impacto significativo no crescimento de *L. monocytogenes* neste grupo.

Portanto, os resultados sugerem que o tratamento Alternativo tem potencial para inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em comparação com o Tradicional, especialmente em estágios mais avançados (60º e 75º dias). Os dados do experimento sugerem que o tratamento alternativo pode ser mais eficaz na inibição do crescimento de *L. monocytogenes* em comparação com o tratamento tradicional, quando a atividade de água é maior ou igual a 0,955. Isso é evidenciado pela diminuição da contagem de *L. monocytogenes* e pela estabilidade da contagem de bactérias lácticas ao longo do tempo no tratamento alternativo.

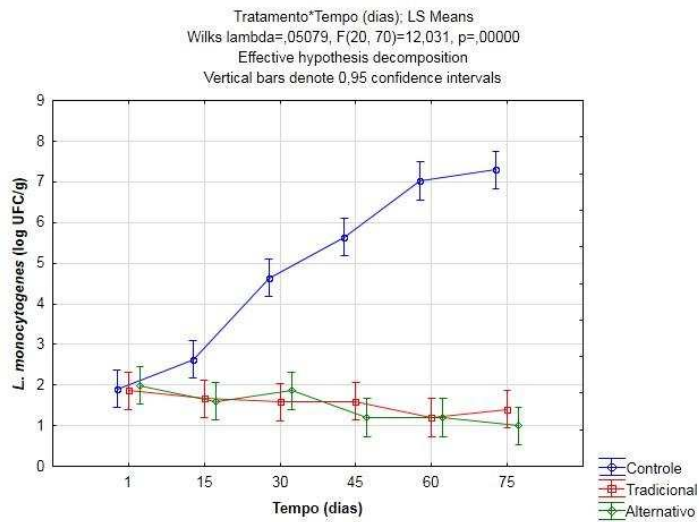
a)



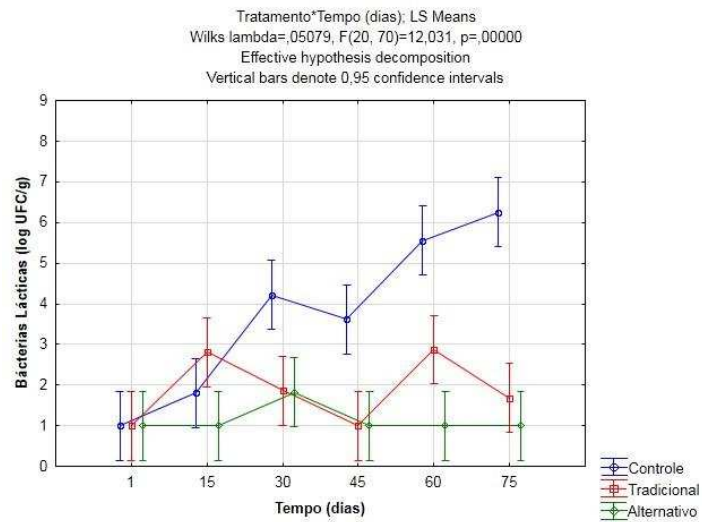
b)



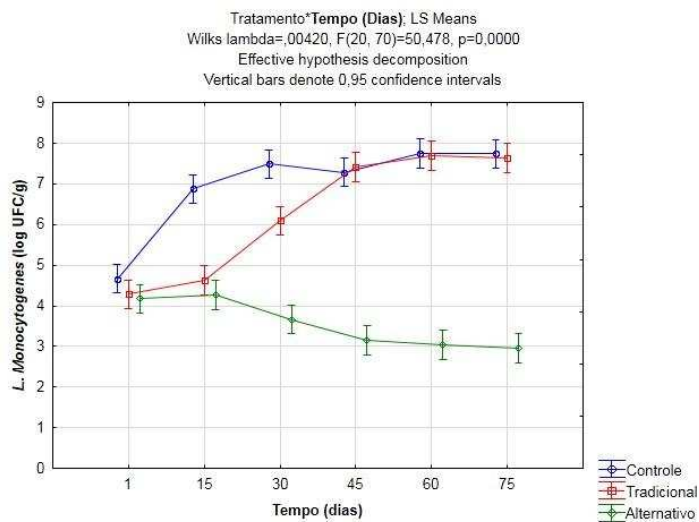
c)



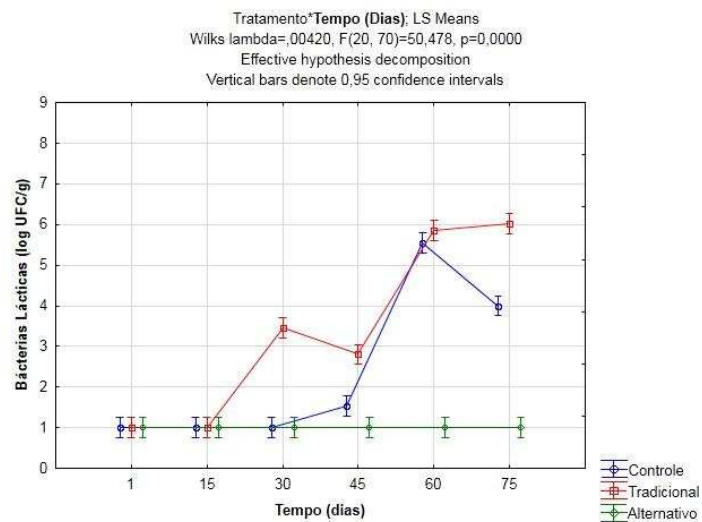
d)



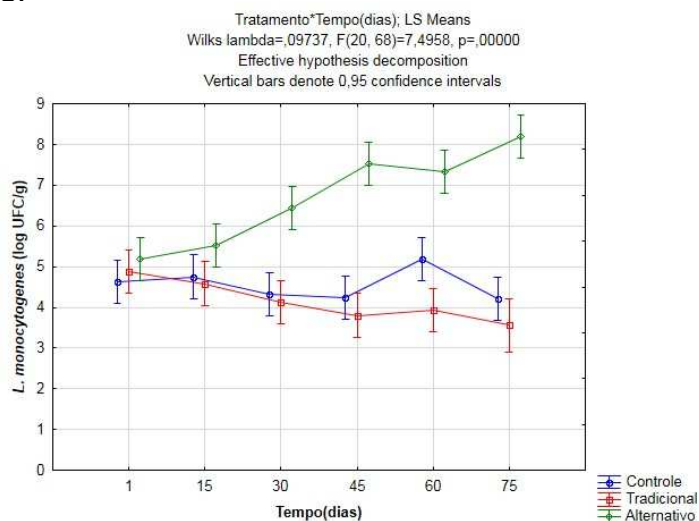
e)



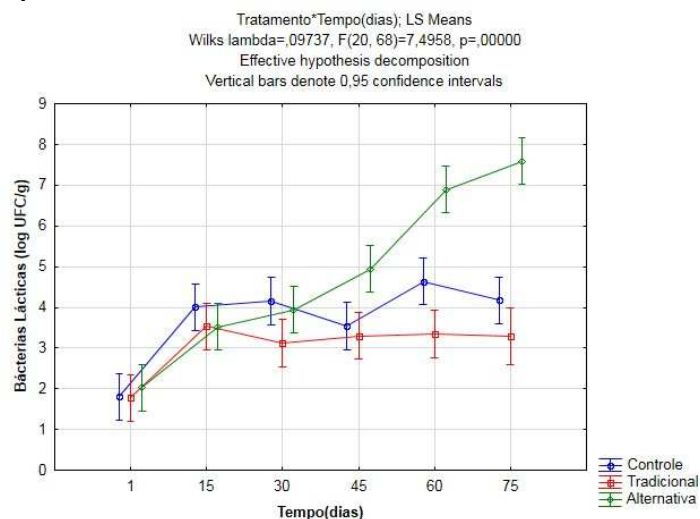
f)



g)



h)



a) Contagens de *L. monocytogenes* – primeiro processo (2 log); b) Contagem de Bactérias lácticas - primeiro processo (2 log); c) Contagens de *L. monocytogenes* – segundo processo (2 log); d) Contagem de Bactérias lácticas - primeiro processo (2 log); e) Contagens de *L. monocytogenes* – primeiro processo (4 log); f) Contagem de Bactérias lácticas - primeiro processo (4 log); g) Contagens de *L. monocytogenes* – segundo processo (4 log); h) Contagem de Bactérias lácticas - segundo processo (4 log);

Figura 6 – Contagens de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas (log UFC/g) em linguiça calabresa fatiada embalada a vácuo durante armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ por 75 dias.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que compostos antimicrobianos alternativos são eficazes no controle do crescimento de *L. monocytogenes* em linguiças calabresas fatiadas e refrigeradas. Durante os 75 dias de armazenamento, as amostras tratadas com compostos antimicrobianos de fontes alternativas apresentaram contagens significativamente menores em comparação com o tratamento tradicional, com uma redução de até 1,22 log UFC/g ao final do período, demonstrando uma capacidade superior de controle microbiológico. Além de reduzir o crescimento de *L. monocytogenes*, o tratamento alternativo também foi eficaz em inibir o crescimento de bactérias lácticas, promovendo estabilidade microbiológica ao longo período avaliado.

Os dois processos testados, ambos com inoculação de *L. monocytogenes*, mostraram que as formulações utilizadas, combinadas com condições físico-

químicas como valores de atividade de água $\leq 0,955$, são eficazes na inibição do crescimento de *L. monocytogenes*.

Esses compostos antimicrobianos de fontes naturais se destacam como uma alternativa promissora para a indústria cárnea, oferecendo uma opção de produtos com menor conteúdo sintético e atendendo à crescente demanda por alimentos mais saudáveis. A ação combinada dos fatores físico-químicos e dos tratamentos antimicrobianos alternativos potencializa a inibição de *L. monocytogenes*, o que representa uma estratégia eficaz para garantir a estabilidade microbiológica de produtos similar.

Para estudos futuros, é essencial avaliar a eficácia dos compostos alternativos contra outros patógenos alimentares comuns, como *Salmonella*, *Clostridium* e *Escherichia coli*, a fim de ampliar o conhecimento sobre sua aplicabilidade. Adicionalmente, recomenda-se a investigação do potencial formação de nitrosaminas nesses produtos, devido aos riscos que esses compostos podem representar à saúde humana.

7. REFERÊNCIAS

Aaslyng, M. D. et al. Cooking loss and juiciness of pork in relation to raw meat quality and cooking procedure. **Food quality and preference**, v. 14, n. 4, p. 277-288, 2003.

ABIA - Associação Brasileira da Indústria de Alimentos. Disponível em: <<https://www.abia.org.br/downloads/numeros-mercado-interno-ABIA2023.pdf>>. Acesso em jun de 2024.

ADMIN. Higiene na Indústria de Alimentos: Garantindo Qualidade e Segurança dos Produtos. Disponível em: <<https://lignumconsultoria.com/2024/02/01/higiene-na-industria-de-alimentos-garantindo-qualidade-e-seguranca-dos-produtos/>>. Acesso em: 1 ago. 2024.

Agrimídia. Aditivos naturais para uso em produtos cárneos, 2021. Disponível em: <https://www.suinoindustria.com.br/imprensa/aditivos-naturais-para-uso-em-produtos-carneos/20210107-092008-P007>. Acesso em mai. de 2023.

Ahmad, S. R., Gokulakrishnan, P., Giriprasad, R., & Yatoo, M. A. Fruit-based natural antioxidants in meat and meat products: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 55, n. 11, p. 1503-1513, 2015.

Alahakoon, A. U., Jayasena, D. D., Ramachandra, S., & Jo, C. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 37-49, 2015.

Altshul, S. F. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.

Anderson, M. E., Marshall, R. T., Stringer, W. C., Naumann, H. D. Efficacies of three sanitizers under six conditions of application to surfaces of beef. **Journal of food science**, v. 42, n. 2, p. 326-329, 1977.

Augustin, J.C. et al. Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 746-754, 2011.

Auvolat, A., Besse, N. G. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. **Food microbiology**, v. 53, p. 135-149, 2016.

Ávila, D. P. et al. Detecção de genes de resistência a antimicrobianos em isolados de *Listeria monocytogenes* de origem alimentar. 2021.

Awad, A. M., Kumar, P., Ismail-Fitry, M. R., Jusoh, S., Ab Aziz, M. F., Sazili, A. Q. Overview of plant extracts as natural preservatives in meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 8, p. e16796, 2022.

Bacus, J. Natural Ingredients for Cured and Smoked Meats, Chr. Hansen Inc. In: **59th Reciprocal Meats Conference, Gainesville, Florida**. 2006.

Barancelli, G. V. et al. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 155-168, 2020.

Barbanti, D.; Mucchetti, G. **Steam oven cooking: effect of different relative humidities on physical characteristics, water status and sensorial quality of turkey meat**. 2010.

Baretta, Camila et al. Qualidade físico-química e microbiológica de linguiça colonial comercializada na feira do produtor de Cascavel/PR, 2018.

Ben Braïek, O., Smaoui, S. Chemistry, safety, and challenges of the use of organic acids and their derivative salts in meat preservation. **Journal of Food Quality**, v. 2021, p. 1-20, 2021.

Benedicti, C. M. **Produção de linguiça frescal (toscana) através de cura natural com extrato de aipo (*Apium graveolens*)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Bernardo, R. et al. Estimating *Listeria monocytogenes* Growth in Ready-to-Eat Chicken Salad Using a Challenge Test for Quantitative Microbial Risk Assessment. **Risk Analysis**, v. 40, n. 11, p. 2427-2441, 2020.

Bezerra, M. V. P. et al. Microbiological and physico-chemical evaluation of toscana sausage in the city of Mossoró, state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 297-300, 2012.

bioMérieux. Densimat® User Manual. Marcy-l'Étoile, France: bioMérieux,

Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** – ANVISA 2022a. Resolução RDC nº 724. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-724-de-1-de-julho-de-2022-413364812>. Acesso em Nov de 2022.

Brasil. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** – ANVISA 2022b. Instrução Normativa nº 161, de 01 de julho de 2022. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>. Acesso em Nov de 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 272, de 14 de março de 2019. Aprova o Regulamento Técnico que dispõe sobre aditivos alimentares para uso em carnes e produtos cárneos, suas respectivas funções, limites máximos e condições de uso. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2019. Disponível em: https://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/67378977/do1-2019-03-18-resolucao-dadiretoria-colegiada-rdc-n-272-de-14-de-marco-de-2019-67378770>. Acesso em out de 2022.

Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 4, de 31 de março de 2000.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA: VOLUME 6** - 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/anuario-dos-programas-de-controle-de-alimentos-de-origem-animal-do-dipoa/anuario-dos-programas-de-controle-de-alimentos-de-origem-animal-volume-6.pdf>. Acesso em Jan de 2024.

Brasil. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/arquivos-controle-de-patogenos/in_09-de_8_de_abril_de_2009.pdf. Acesso em Jan 2024. Acesso em Nov de 2022.

Bremer, P. J., Monk, I. A. N., Osborne, C. M. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. **Journal Of Food Protection**, v. 64, n. 9, p. 1369-1376, 2001.

Brito, S. I. S. D. **Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos processados à base de carne e em superfícies de contacto**. 2021. Tese de Doutorado.

Camargo, A. C., Woodward, J. J., Call, D. R., Nero, L. A. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 11, p. 623-636, 2017.

Cauchie, E., Gand, M., Kergourlay, G., Taminiau, B., Delhalle, L., Korsak, N., & Daube, G. The use of 16S rRNA gene metagenetic monitoring of refrigerated food products for understanding the kinetics of microbial subpopulations at different storage temperatures: the example of white pudding. **International journal of food microbiology**, v. 247, p. 70-78, 2017.

Chen, C., Chen, L., Mao, C., Jin, L., Wu, S., Zheng, Y., Liu, X. Natural Extracts for Antibacterial Applications. **Small**, p. 2306553, 2023.

Cherobin, A. K., do Amaral, A. M. P., Moroni, L. S., Cavaleiro, D., & Sehn, G. A. R. Extrato de espinafre como fonte de nitrito em linguiça frescal: atributos de qualidade e estabilidade durante o armazenamento refrigerado. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 18, p. e76179-e76179, 2023.

Christieans, S., Picgirard, L., Parafita, E., Lebert, A., Gregori, T. Impact of reducing nitrate/nitrite levels on the behavior of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in French dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 137, p. 160-167, 2018.

Cornu, M., Billoir, E., Bergis, H., Beaufort, A., & Zuliani, V. Modeling microbial competition in food: Application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. **Food Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 639-647, 2011.

Correia, M., Barroso, Â., Barroso, M. F., Soares, D., Oliveira, M. B. P. P., Delerue-Matos, C. Contribution of different vegetable types to exogenous nitrate and nitrite exposure. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 960-966, 2010.

Currie, A. et al. Multi-province listeriosis outbreak linked to contaminated deli meat consumed primarily in institutional settings, Canada, 2008. **Foodborne pathogens and disease**, v. 12, n. 8, p. 645-652, 2015.

De Curtis, M. L.; Franceschi, O.; De Castro, N. *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. **Archivos latinoamericanos de nutricion**, v. 52, n. 3, p. 282-288, 2002.

Dams, R. I. **Microbiologia Geral e de Alimentos**. Freitas Bastos, 2023.

David, J. R.; Steenson, L. R.; Davidson, P. M. Expectations and applications of natural antimicrobials to foods. **Food Protection Trends**, v. 33, n. 4, p. 238-47, 2013.

De Oliveira, Fernanda. **Avaliação da atividade antimicrobiana do vinagre em cortes de dianteiro bovino embalado a vácuo**. 2006. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.

Del Pulgar, J. S., Gázquez, A., Ruiz-Carrascal, J. Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature, and cooking time. **Meat science**, v. 90, n. 3, p. 828-835, 2012.

Delgado-Pando, G. et al. Clean label alternatives in meat products. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1615, 2021.

Devèze, C. C. Substituição de nitrito de sódio por extrato vegetal na elaboração de produto cárneo cozido enlatado. 2021.

Devlieghere, F., Geeraerd, A. H., Versyck, K. J., Vandewaetere, B., Van Impe, J., Debevere, J. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. **Food microbiology**, v. 18, n. 1, p. 53-66, 2001.

Dias, B. J. D. **Estudo da qualidade microbiológica de produtos de charcutaria**. Dissertação de Mestrado. Universidade Catolica Portuguesa (Portugal), 2020.

Dickson, J. S., Siragusa, G. R. Survival of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* during storage on beef sanitized with organic acids. **Journal Of Food Safety**, v. 14, n. 4, p. 313-327, 1994.

Duarte, R. S. Microorganismos mais frequentemente encontrados com limites acima dos aceitáveis, segundo a RDC nº 12/2001 da ANVISA em produtos de origem animal, registrados juntos à CISPOA. 2011.

Estelles, R. S. Importância do controle da temperatura e do tratamento térmico na preservação dos nutrientes e da qualidade dos alimentos. 2003.

Fai, A. E. C., Figueiredo, E. A. T. D., Verdin, S. E. F., Pinheiro, N. M. D. S., Braga, A. R. C., Stamford, T. L. M. *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 657-662, 2011.

Feiner, G. **Meat products handbook: Practical Science and Technology**. Elsevier, 2006.

Feitosa, T. Contaminação, conservação e alteração da carne. 1999.

Feltes, G. et al. Caracterização microbiológica de linguças tipo calabresa produzidas em escala industrial com diferentes conservantes. In: VI ENCONTRO DE DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AGROINDUSTRIAIS, 6., 09-10 dez. 2022, Uberaba. Anais [...]. Uberaba: [s.n.], 2022.

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

Anthony J. F. Water Activity's Role in Food Safety and Quality. 2001 **Food Safety**. Disponível em: <<https://www.food-safety.com/articles/4420-water-activitye28099s-role-in-food-safety-and-quality>>. Acesso em: 02 fev. 2024.

Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. **Microbiologia de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2017.

Fruet, A. P. B., Nörnberg, J. L., Calkins, C. R., De Mello, A. Effects of different antioxidants on quality of beef patties from steers fed low-moisture distillers grains. **Meat science**, v. 154, p. 119-125, 2019.

FSIS. Constituent Update March 17, 2023. FSIS, 2023. Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/news-events/news-press-releases/constituent-update-march-17-2023>>. Acesso em jan de 2024.

Furtado, A. A. L. Tratamento Térmico. **EMBRAPA Agroindústria de Alimentos**, 2021. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/tipos-de-processos/tratamento-termico>>. Acesso em Jun. de 2023.

Gallo, M., Ferrara, L., Calogero, A., Montesano, D., Naviglio, D. Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. **Food Research International**, v. 137, p. 109414, 2020.

Gandra, E. Á., Gandra, T. K. V., de Mello, W. S., da Silva Godoi, H. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

Gehlen, S. S. Dinâmica de formação de biofilmes multiespécies de *Salmonella Enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e efeitos de procedimentos de higienização. 2016.

Geletu, U. S. et al. Quality of cattle meat and its compositional constituents. **Veterinary Medicine International**, v. 2021, n. 1, p. 7340495, 2021.

Glass, K. A., Granberg, D. A., Smith, A. L., Mcnamara, A. M., Hardin, M., Mattias, J., Johnson, E. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by sodium diacetate and sodium lactate on wieners and cooked bratwurst. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 116-123, 2002.

Gmeiner, Njage, P. M. K., Hansen, L. T., Aarestrup, F. M., & Leekitcharoenphon, P. Predicting *Listeria monocytogenes* virulence potential using whole genome sequencing and machine learning. **International Journal of Food Microbiology**, v. 410, p. 110491, 2024.

Golden, M. C., McDonnell, L. M., Sheehan, V., Sindelar, J. J., Glass, K. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Deli-Style Turkey Breast formulated with cultured celery powder and/or Cultured Sugar–Vinegar Blend during Storage at 4 C. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 10, p. 1787-1793, 2014.

Gomides, E. T.; Ribeiro, L. F. Determinação De Microrganismos Deteriorantes Em Linguiça Calabresa, Antes E Após O Cozimento. **Revista GeTeC**, v. 10, n. 29, 2021.

Goncalves, A. C., Almeida, R. C. C., Alves, M. A. O., & Almeida, P. F. Quantitative investigation on the effects of chemical treatments in reducing *Listeria monocytogenes* populations on chicken breast meat. **Food control**, v. 16, n. 7, p. 617-622, 2005.

González, P. J. et al. Bacterial nitrate reductases: molecular and biological aspects of nitrate reduction. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 5-6, p. 1015-1023, 2006.

Gray, M. J., Zadoks, R. N., Fortes, E. D., Dogan, B., Cai, S., Chen, Y., .. & Wiedmann, M. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5833-5841, 2004.

Hammes, W. P. Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. **Food Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 151-156, 2012.

Hartmann, A. A., Silva, R. R. D. **Estudo do uso combinado de lactato de sódio e cloreto de cálcio em peito de frango defumado**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Haubert, L. et al. Caracterização molecular da resistência a antimicrobianos em *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos e ambientes de processamento, 2018.

Health Canada. *Listeria monocytogenes* challenge testing of refrigerated ready-to-eat foods. **Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate, Health Products and Food Branch**, 2012.

Heir, E., Moretro, T., Simensen, A., Langsrud, S. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 275, p. 46-55, 2018.

Heuer, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

Honikel, K. O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat science**, v. 49, n. 4, p. 447-457, 1998.

Horsch, A. M., Sebranek, J. G., Dickson, J. S., Niebuhr, S. E., Larson, E. M., Lavieri, N. A., Wilson, L. A. The effect of pH and nitrite concentration on the antimicrobial impact of celery juice concentrate compared with conventional sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. **Meat science**, v. 96, n. 1, p. 400-407, 2014.

Hui, Y. H. (Ed.). **Handbook of meat and meat processing**. CRC press, 2012.

Hygreeva, D., Pandey, M. C., & Radhakrishna, K. Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. **Meat science**, v. 98, n. 1, p. 47-57, 2014.

Ichiro Sakate, R. et al. Quantificação de *Listeria monocytogenes* em salames fatiados embalados a vácuo. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 53, n. 2, p. 184-187, 2003.

Iglesias, M. A., Kroning, I. S., Decol, L. T., de Melo Franco, B. D. G., da Silva, W. P. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food research international**, v. 100, p. 96-101, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium**. ISO 6888-1:2021. Geneva, Switzerland, 2021.

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

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 1: Detection method**, 2st ed. 11290-1:2017, Geneva, Switzerland. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. – Part 2: Enumeration Method**, 2st ed. 11290-2:2017, Geneva, Switzerland. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria**. ISO 15214:1998, Geneva, Switzerland. 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Microbiology of food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. Part 1: Detection of *Salmonella* spp**. 2020. Amendment 1: Broader range of incubation temperatures, amendment to the status of Annex D, and correction of the composition of MSRV an SC, 03/2020, ISO 6579-1:2017/AMD.1:2020 (E), Geneva, Switzerland.

Iocca, A. F. S. Efeitos da aplicação de salmoura com plasma bovino em biceps femoris (coxão duro) injetado, cru e cozido na estabilidade física, química, microbiológica e sensorial. 2009.

Jay, J. M. Listerioses de origem animal. In: Microbiologia de alimentos, Porto Alegre, v. 6, p. 517-542, 2005.

Kim, T. K., Hwang, K. E., Lee, M. A., Paik, H. D., Kim, Y. B., Choi, Y. S. Quality characteristics of pork loin cured with green nitrite source and some organic acids. **Meat science**, v. 152, p. 141-145, 2019.

Krause, B. L. **Incubation of curing brines for the production of ready-to-eat uncured ham**. Iowa State University, 2009.

Kruger, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça fresca refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Labadie, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. **Meat Science**, v. 52, n. 3, p. 299-305, 1999.

Labbe, R.G. *Clostridium perfringens*. In SALFINGER, Yvonne; TORTORELLO, Mary Lou (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association, 2015.

Lianou, A. e Sofos, J. N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p. 2172-2198, 2007.

Lima, K. P. D. **Produção de vinagre como estratégia de aproveitamento tecnológico da amora-preta: avaliação do processo submerso e do processo lento**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Long, N. B. S., Gál, R., & Buňka, F. Use of phosphates in meat products. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 86, p. 19874-19882, 2011.

Lu, J. et al. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2076-2080, 2000.

Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Silva, J., Almeida, G., Gibbs, P., & Teixeira, P. *Listeria monocytogenes*. U: **Encyclopedia of Food Safety**. Vol. 1. 2014.

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

Marques, F. P. P. Características físico-químicas, nutricionais e sensoriais de vinagres de diferentes matérias-primas. 2010.

Matle, I.; Mbatha, K. R.; Madoroba, E. A review of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 87, n. 1, p. 1-20, 2020.

Maury, M. M., Tsai, Y. H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., .. & Lecuit, M. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. **Nature Genetics**, v. 48, n. 3, p. 308-313, 2016.

Mbandi, E., Shelef, L. A. Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* in meat by combinations of sodium lactate and diacetate. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 640-644, 2001.

McClure, P. J., Kelly, T. M., Roberts, T. A. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 77-91, 1991.

McDonnell, L. M., Glass, K. A., & Sindelar, J. J. Identifying ingredients that delay outgrowth of *Listeria monocytogenes* in natural, organic, and clean-label ready-to-eat meat and poultry products. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 8, p. 1366-1376, 2013.

Mellefont, L. A., Ross, T. Effect of potassium lactate and a potassium lactate–sodium diacetate blend on *Listeria monocytogenes* growth in modified atmosphere packaged sliced ham. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2297-2305, 2007.

Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P. A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 213-216, 2004.

Moltz, A. G., & Martin, S. E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 92-97, 2005.

Moraes, I. P. D. **Hidrogéis contendo ácidos orgânicos aplicados como absorventes para embalagens de produtos cárneos**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Moreira, R. **Revista FOOD INGREDIENTS BRASIL Nº 19**. 2011. Disponível em: <https://revista-fi.com/upload_arquivos/201606/2016060045028001467202209.pdf>. Acesso em ago de 2022.

Motsoaledi, A. Media statement by the Minister of Health Dr Aaron Motsoaledi regarding the update on the Listeriosis outbreak in South Africa. Department: **Health. Republic of South Africa**, 2018. Disponível em: <<https://www.gov.za/speeches/media-statement-minister-health-listeriosis-outbreak-5-sep-2018-0000>>. Acesso em Mai de 2022.

Murey, A., Bowers, J. W., Bauermeister, L. J., Singh, M., Huang, T. S., & McKee, S. R. Effect of salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, shelf life, meat quality, and consumer acceptability of beef frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 1, p. M54-M60, 2014.

Nassu, R. T. Fabricação de produtos cárneos. Embrapa: Agência de Informação Tecnológica, 2021. Disponível: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos>>. Acesso em Mai. De 2023.

Novello, D., Pollonio, M. A. R. . Tendências na reformulação de produtos cárneos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 13, n. 2, p. 689-702, 2015.

Nunes, M. D. S. Estudo de alternativas naturais a aditivos utilizados em produtos cárneos à base de aves na Empresa X. **Universidade Nova de Lisboa**, setembro, 2013.

da Nóbrega Santos, E. Incorporação de extrato de resíduo agroindustrial de acerola em embalagem biodegradável e seu efeito sobre a qualidade de hambúrguer bovino. 2020.

Nychas, G. J. E., Drosinos, E. H., Board, R. G. Chemical changes in stored meat. **The Microbiology of Meat and Poultry**, v. 1, p. 288-320, 1998.

O'Grady, M.N.; Kerry, J.P. Prevention of quality deterioration in meat and poultry. In Skibsted, L.H. Chemical deterioration and physical instability of food and beverages. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 711 p., 2010.

Oliveira, G. L. D. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

Olivo, R. S. **Atividade de compostos antimicrobianos para aplicação em produtos cárneos processados prontos para consumo visando controle de *Listeria monocytogenes***. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

Osek, J., Lachtara, B., e Wieczorek, K. *Listeria monocytogenes*—how this pathogen survives in food-production environments?. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 866462, 2022.

Oswell, N. J., Thippareddi, H., Pegg, R. B. Practical use of natural antioxidants in meat products in the US: A review. **Meat Science**, v. 145, p. 469-479, 2018.

Park, N. Y., Hong, S. H., & Yoon, K. S. Effects of commercial marinade seasoning and a natural blend of cultured sugar and vinegar on *Campylobacter jejuni* and *Salmonella Typhimurium* and the texture of chicken breasts. **Poultry Science**, v. 93, n. 3, p. 719-727, 2014.

Pegg, R. B., Shahidi, F. **Nitrite curing of meat: The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives**. John Wiley & Sons, 2008.

Pennington, J. A. Dietary exposure models for nitrates and nitrites. **Food Control**, v. 9, n. 6, p. 385-395, 1998.

Pereira, A. A. M. et al. **Conservação de produtos cárneos: Avaliação da estabilidade Microbiológica de fiambres**. 2012. Dissertação de Mestrado.

Perumalla, A. V. S., Hettiarachchy, N. S., Over, K. F., Ricke, S. C., Gbur, E. E., Zhang, J., & Davis, B. Effect of potassium lactate and sodium diacetate combination to inhibit *Listeria monocytogenes* in low and high fat chicken and turkey hotdog model systems. **Open Food Sci J**, v. 6, n. 1, p. 16-23, 2012.

Pietrobon, A. R., & da Trindade Alfaro, A. Substituição de aditivos sintéticos por extratos vegetais em derivados cárneos. in: **Ciência e tecnologia de alimentos: o avanço da ciência no Brasil-volume 6. editora científica Digital**, 2023. p. 138-149.

Pinheiro, R. S. B. et al. Composição química e rendimento da carne ovina in natura e assada. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 154-157, 2008.

Pinton, M. B. et al. Green technologies as a strategy to reduce NaCl and phosphate in meat products: An overview. **Current Opinion in Food Science**, v. 40, p. 1-5, 2021.

Ponrajan, A., Harrison, M. A., Pringle, T. D., Segers, J. R., Lowe, B. K., McKeith, R. O., Stelzleni, A. M. Effect of sodium citrate plus sodium diacetate or buffered vinegar on quality attributes of enhanced beef top sirloins. **Meat Science**, v. 91, n. 1, p. 43-49, 2012.

Porto-Fett, A. C., Campano, S. G., Shoyer, B. A., Wadsworth, S., Luchansky, J. B. Viability of *Listeria monocytogenes* on uncured turkey breast commercially prepared with and without buffered vinegar during extended storage at 4 and 10 C. **Journal of food protection**, v. 77, n. 6, p. 987-992, 2014.

Pothakos, V., Devlieghere, F., Villani, F., Björkroth, J., Ercolini, D. Lactic acid bacteria and their controversial role in fresh meat spoilage. **Meat Science**, v. 109, p. 66-74, 2015.

Proteste. A PROTESTE comprova: carne está contaminada. Disponível em: <<https://www.proteste.org.br/alimentacao/carne/noticia/a-proteste-comprova-carne-esta-contaminada>> 2017. Acesso em Mai de 2022.

Puolanne, E., Halonen, M. Theoretical aspects of water-holding in meat. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 151-165, 2010.

Ramires, T., Kleinubing, N. R., Iglesias, M. A., Vitola, H. R. S., Nuncio, A. S. P., Kroning, I. S., da Silva, W. P. Genetic diversity, biofilm and virulence characteristics of *Listeria monocytogenes* in salmon sushi. **Food Research International**, v. 140, p. 109871, 2021.

Ravindhiran, R., Sivarajan, K., Sekar, J. N., Murugesan, R., Dhandapani, K. *Listeria monocytogenes* an emerging pathogen: a comprehensive overview on listeriosis, virulence determinants, detection, and anti-listerial interventions. **Microbial Ecology**, v. 86, n. 4, p. 2231-2251, 2023.

Realini, C. E., Guàrdia, M. D., Díaz, I., García-Regueiro, J. A., Arnau, J. Effects of acerola fruit extract on sensory and shelf-life of salted beef patties from grinds differing in fatty acid composition. **Meat Science**, v. 99, p. 18-24, 2015.

REVISTA FIB. Escolhendo o Ácido Orgânico Correto na Conservação de Carnes. **Revista FIB**, 2017. Disponível em: <<https://revista-fi.com/artigos/conservantes/escolhendo-o-acido-organico-correto-na-conservacao-de-carne>>. Acesso em: 24 de jun. 2023>.

Ribeiro, J. S., Santos, M. J. M. C., Silva, L. K. R., Pereira, L. C. L., Santos, I. A., da Silva Lannes, S. C., da Silva, M. V. Natural antioxidants used in meat products: A brief review. **Meat Science**, v. 148, p. 181-188, 2019.

Riel, G., Boulaaba, A., Popp, J., Klein, G. Effects of parsley extract powder as an alternative for the direct addition of sodium nitrite in the production of mortadella-type sausages–Impact on microbiological, physicochemical and sensory aspects. **Meat Science**, v. 131, p. 166-175, 2017.

Ristori, C. A., Rowlands, R. E. G., Martins, C. G., Barbosa, M. L., Yoshida, J. T., de Melo Franco, B. D. Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 12, p. 969-973, 2014.

Roça, R. O. Tecnologia da carne e produtos derivados. 2000.

Rodrigues, C. S., de Sá, C. V. G. C., de Melo, C. B. . *Listeria monocytogenes* contamination in industrial sausages. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 40, n. 1, p. e009118-e009118, 2018.

Rodrigues, C. S., Sá, C. V. G. C. D., Melo, C. B. D. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. **Ciência Rural**, v. 47, p. e20160721, 2016.

Ryser, E. T. *Listeria*. In: **Infecções e intoxicações transmitidas por alimentos**. Imprensa Acadêmica, 2021. p. 201-220.

Saleh, M. M. et al. Avaliação microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Duque de Caxias/RJ. 2019.

Sallam, K. I., Samejima, K. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 37, n. 8, p. 865-871, 2004.

Samelis, J., Bedie, G. K., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A., & Smith, G. C. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4 C in vacuum packages. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 2, p. 299-307, 2002.

Sarker, M. I. A. et al. Food grade vinegar acts as an effective tool for short-term meat preservation. **Meat Research**, v. 1, n. 1, 2021.

Schaffner, D. W. Opportunities for *Listeria* contamination in meat and poultry processing plants. **Journal of food protection**, v. 8, 2018.

Scott, V. N. et al. Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. 2005.

SEBRAE. **Atividade de água em alimentos: reações que ocorrem nos diferentes níveis de atividade de água e sua influência na conservação de alimentos.** Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI-RS, Departamento Regional, 2013. Disponível em: https://sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/SBRT/pdfs/24843_59178.pdf https://sebrae.com.br/Sebrae/Portal Sebrae/SBRT/pdfs/24843_59178.pdf. Acesso em: 02 nov. 2023.

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

Sebranek, J. G., Jackson-Davis, A. L., Myers, K. L., Lavieri, N. A. Beyond celery and starter culture: Advances in natural/organic curing processes in the United States. **Meat Science**, v. 92, n. 3, p. 267-273, 2012.

Shah, M. A., Bosco, S. J. D., Mir, S. A. Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. **Meat Science**, v. 98, n. 1, p. 21-33, 2014.

Shaheen, M. S., Shaaban, H. A., Hussein, A. M., Ahmed, M. B., El-Massry, K., El-Ghorab, A. Evaluation of chitosan/fructose model as an antioxidant and antimicrobial agent for shelf life extension of beef meat during freezing. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 4, 2016.

Silva F., E. D. Desenvolvimento de teste rápido para detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos. 2018.

Silva, F. S.; Ferreira, V. C.; Souza, V. B.; Nunes, I. L. Detection of *Listeria monocytogenes* in Brazilian sausage processing plants. **Food Control**, v. 71, p. 52-56, 2017.

Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A.; Taniwaki, M. H.; Gomes, R. A. R.; Okazaki, M. M.; Iamanaka, B. T. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 6. ed. São Paulo: Editora Blucher, p. 265-290, 2021.

da Silva, A. P. G., Guerra, J. M. C., de Oliveira, M. M. B., da Silva Vieira, D. D., da Silva, M. J. C., Ferreira, M. C., .. & Barbosa Filho, J. P. M. Aplicação de extrato vegetal no processamento de produtos cárneos como alternativa de substituição de nitrito residual: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 89816-89827, 2021.

da Silva, M. T. et al. Fat deposition, fatty acid composition, and its relationship with meat quality and human health. **Meat science and nutrition**, p. 17-37, 2018.

Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Olson, D. G., Sebranek, J. G., Love, J. A. Investigating quality attributes and consumer acceptance of uncured, No-nitrate/nitrite-

added commercial hams, bacons, and frankfurters. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. S551-S559, 2007.

Sindelar, J. J., Milkowski, A. L. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. **Nitric oxide**, v. 26, n. 4, p. 259-266, 2012.

Singh, G., Singh, O. P., Maurya, S. Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian Curcuma species. **Progress in Crystal Growth and Characterization of materials**, v. 45, n. 1-2, p. 75-81, 2002.

Sipailiene, A., Venskutonis, PR, Sarkinas, A., & Cypiene, V. Composição e atividade antimicrobiana de extratos de folhas e raízes de aipo (*Apium graveolens*) obtidos com dióxido de carbono líquido. In: **III Congresso WOCMAP de Plantas Medicinais e Aromáticas - Volume 3: Perspectivas em Química de Produtos Naturais 677** . 2003. pág. 71-77.

Soares, V. C. C. **Propriedades antimicrobianas e antioxidantes de vinagres de frutos**. 2022. Tese de Doutorado.

Soares, V. M., Padilha, M. B., Guerra, M. E. D. M., Schneider, F. A., Gasparetto, R., Santos, E. A. R. D., Pereira, J. G. Identification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and indicator microorganisms in commercialized raw meats and fresh sausages from Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 51, p. e20200569, 2021.

Souto, V. O.; Almeida, R. S. Composição, características gerais e estabilidade oxidativa em produtos cárneos: uma revisão. **Agron Food Academ**, 2021. Disponível em: < <https://agronfoodacademy.com/composicao-caracteristicas-gerais-e-estabilidade-oxidativa-em-produtos-carneos-uma-revisao/> >. Acesso em jan de 2023.

Teixeira, J. S., Repková, L., Gänzle, M. G., McMullen, L. M. Effect of pressure, reconstituted RTE meat microbiota, and antimicrobials on survival and post-pressure growth of *Listeria monocytogenes* on ham. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 347030, 2018.

Theron, M. M., Lues, J. F. Organic acids and meat preservation: a review. **Food Reviews International**, v. 23, n. 2, p. 141-158, 2007.

Tozo, I. A. **Tocobiol® e extrato de acerola como antioxidantes naturais em salame tipo milano**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Trindade, M. A., Nunes, T. P., Contreras-Castillo, C. J., Felício, P. E. D. Oxidative and microbiological stability of mechanically separated hen meat pre blended with antioxidants during frozen storage. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 160-168, 2008.

USGS. pH and Water. 2019. Disponível em: <<https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/ph-and-water>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

Valderrama, W. B., Cutter, C. N. An ecological perspective of *Listeria monocytogenes* biofilms in food processing facilities. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 8, p. 801-817, 2013.

Webber, V. Não conformidades em estabelecimentos registrados na inspeção municipal de alimentos de origem animal de Caxias do Sul. 2023.

WHO - World Health Organization. Ingested nitrate and nitrite and cyanobacterial peptide toxins, IARC monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans, Lyon, France. **International Agency for Research on Cancer**, v. 94, p. 462, 2010.

WHO - World Health Organization. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants: prepared by the Seventy fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**, 2003. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44813>. Acesso em mai de 2022.

WHO - World Health Organization. **Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food / prepared by the forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**, 1996. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37491>. Acesso em mai de 2022.

WHO- World Health Organization. ***Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) food: attribution, characterization and monitoring: meeting report**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022.

Wood, H. Cost of product recalls. Disponível em: <https://www.rentokil.com/blog/industry-insights/cost-of-product-recalls>> 2017. Acesso em Fev de 2023.

Xi, Y., Sullivan, G. A., Jackson, A. L., Zhou, G. H., Sebranek, J. G. Effects of natural antimicrobials on inhibition of *Listeria monocytogenes* and on chemical, physical and sensory attributes of naturally-cured frankfurters. **Meat Science**, v. 90, n. 1, p. 130-138, 2012.

Zhang, X., Wang, S., Chen, X., & Qu, C. Review controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products: An overview of outbreaks, current legislations, challenges, and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 24-35, 2021.

Zhou, Y., Wang, Q., Wang, S. Effects of rosemary extract, grape seed extract and green tea polyphenol on the formation of N-nitrosamines and quality of western-style smoked sausage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 6, p. e14459, 2020.