



DETERMINAÇÃO DOS REQUERIMENTOS DE GERMINAÇÃO DOS ESPOROS DE *Clostridium perfringens* E *Clostridium sporogenes* EM PRODUTOS CÁRNEOS

Luana **Luchi**¹, Thais **Marini**², Anderson de Souza **Sant’Ana**³, Renata **Bromberg**⁴, Míriam
Gonçalves **Marquezini**⁵

Nº 20234

RESUMO

C. botulinum e *C. perfringens* são bactérias patogênicas de grande importância para a saúde pública e o conhecimento de seus requerimentos de crescimento é essencial para que a indústria de carnes possa garantir a segurança microbiológica de seus produtos. O uso do *C. sporogenes* como indicador de *C. botulinum* em estudos de avaliação de segurança é recomendado quando o laboratório não possui nível de segurança adequado para manipulação deste patógeno. Assim, objetivo deste projeto foi estudar as características fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e de crescimento de cepas de *C. sporogenes* e *C. perfringens*, obtidas a partir de coleções de cultura e isoladas de produtos cárneos. As linhagens de *C. sporogenes* e *C. perfringens* apresentaram sensibilidade a todos os ácidos orgânicos avaliados (acético, cítrico, láctico, málico, tartárico e propiônico), e resistência ao nitrito de sódio e eritorbato de sódio testados isoladamente ou em combinação. As culturas também apresentaram sensibilidade ao blend com 2% de lactato de sódio, 150ppm de nitrito de sódio e 500ppm de eritorbato de sódio, e também nos blends com substituição por extrato de aipo e acelga nas mesmas proporções. As culturas não apresentaram comportamento variável entre as linhagens. Os resultados deste trabalho indicam que várias categorias de compostos quando aplicados em concentrações adequadas individualmente ou em blends podem inibir a germinação de *C. sporogenes* e *C. perfringens*, porém a aplicação destes ingredientes deverá seguir os níveis preconizados pelos órgãos reguladores.

Palavras-chaves: *C. perfringens*, *C. botulinum*, produtos cárneos, antimicrobianos.

1. Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biologia, Unicamp, Campinas-SP;
2. Colaborador, Assistente Técnico, Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL, Campinas-SP
3. Colaborador, Pesquisador, Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp, Campinas-SP
4. Co-orientador, Pesquisador, Instituto de Tecnologia de Alimentos/ITAL, Campinas-SP
5. Orientadora Assistente Técnico, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP; miriamg@ital.sp.gov.br



ABSTRACT

C. botulinum and *C. perfringens* are pathogenic bacteria of great importance for public health and knowledge of its growth requirements is essential for the meat industry to ensure the microbiological safety of its products. The use of *C. sporogenes* as an indicator of *C. botulinum* in safety assessment studies is recommended when the laboratory doesn't have an adequate level of safety for handling this pathogen. The objective of this project was to study the physiological, morphological, biochemical and growth characteristics of strains of *C. sporogenes* and *C. perfringens* obtained from culture collections and isolated from meat products. The strains of *C. sporogenes* and *C. perfringens* showed sensitivity to most of the organic acids evaluated (acetic, citric, lactic, malic, tartaric and propionic) and resistance to sodium nitrite and sodium erythorbate tested alone or in combination. The cultures also showed sensitivity to the blend with 2% sodium lactate, 150ppm sodium nitrite and 500ppm sodium erythorbate, and also in blends with substitution for celery extract and cherry extract in the same proportions. The cultures didn't show variable behavior between strains. The results of this work indicate that several categories of compounds when applied at adequate concentrations may be inhibitory to the germination of *C. sporogenes* and *C. perfringens* however the application of these ingredients should follow the levels recommended by the regulatory agencies.

Keywords: *C. perfringens*, *C. botulinum*, meat products, antimicrobials.

1. INTRODUÇÃO

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

A toxinfecção alimentar causada pelo a *Clostridium perfringens* é a segunda mais prevalente nos EUA e a sexta mais prevalente no Brasil (GRASS, J. E.; GOULD, L. H.; MAHON, B., 2013). Os surtos de botulismo nos Estados Unidos e no Brasil, são mais comumente causados por cepas proteolíticas, enquanto na Europa, cepas não-proteolíticas (grupo II) são mais comumente associadas a surtos (HAUSCHILD, 1993). Segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014), o Brasil teve 83 casos confirmados de botulismo no período de 1999 a 2014 sendo que destes, 28,9% foram a óbito. A mortadela, a carne esterilizada e a salsicha são os alimentos mais relacionados aos casos de botulismo alimentar no Brasil. Embora a incidência anual de botulismo transmitido por alimentos seja baixa em comparação com outras doenças transmitidas por alimentos, o resultado do processo de intoxicação apresenta alto risco de mortalidade (SUGIYAMA, 1980).



Como medida preventiva, a indústria de alimentos busca diferentes estratégias de intervenção contra a germinação de esporos de *C. botulinum* e de *C. perfringens*, e, conseqüentemente, a produção de toxinas nos alimentos. A esterilização comercial tem sido o processo térmico padrão para o controle destes microrganismos em alimentos estáveis em temperatura ambiente (ANDERSON et al., 2011), entretanto, este processo térmico pode danificar as características físicas e sensoriais de algumas categorias de alimentos, não sendo recomendado para produtos cárneos emulsionados, por exemplo. Alternativamente, o controle da formulação do produto com a acidificação com pH abaixo de 4,6, ajuste da atividade de água (A_w) inferior a 0,93 e o uso de métodos combinados de pH e A_w também são empregados no controle deste patógeno (GLASS & JOHNSON, 2004a; GLASS & JOHNSON, 2004b; NACMCF, 2010; OKEREKE & MONTVILLE, 1991; TANAKA et al., 1986).

O nitrito de sódio é um dos ingredientes mais usados no controle de *Clostridium* spp., que possui um potencial de inibição da germinação dos esporos deste gênero de microrganismo e, também, contribuem para a fixação da cor avermelhada da carne curada. Apesar de aumentar a qualidade e a vida útil do produto, este tipo de aditivo pode causar danos à saúde humana quando usado fora dos limites estabelecidos na legislação (IAMARINO, 2015). Desta forma, alternativas ao uso deste e de outros ingredientes artificiais vem sendo estudadas e adotadas pela indústria de alimentos, a fim de atender à crescente exigência dos consumidores por alimentos mais saudáveis e que garantam a segurança microbiológica dos alimentos.

No Brasil, devido a determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sobre a indisponibilidade de comercialização de linhagens de *C. botulinum* e pela ausência de um laboratório de testes de desafio de alimentos com nível de segurança NB-3, o *Clostridium sporogenes* é usado como um indicador de *C. botulinum* na avaliação da eficácia da segurança de alimentos e processos. O *C. sporogenes* é um microrganismo deteriorante de alimentos (MCCLURE, 2006) e patógeno ocasional (INKSTER, CORDINA, SIEGMETH, 2011). Detém forte semelhança fisiológica com o Grupo I (proteolítico) do *C. botulinum* e é amplamente utilizado como substituto para esse organismo, demonstrando a eficácia da preservação de alimentos e processos (BROWN et al., 2012; TAYLOR et al., 2013). Ao analisarmos os dados do sequenciamento do genoma de ambos os microrganismos é possível confirmar a estreita relação genética de *C. sporogenes* e o Grupo I de *C. botulinum* (CARTER et al., 2009; COLLINS et al., 1994; BRADBURY et al., 2012).

Tendo em vista a complexidade da formulação dos produtos cárneos, especialmente os cozidos e curados e o perigo que *C. botulinum* e *C. perfringens* representam para a segurança microbiológica destes, é necessário que se avalie os requerimentos de crescimento destas bactérias nestes produtos.



2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Origem e conservação dos microrganismos

Neste estudo foram testadas culturas de referência de *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404, ATCC 11437, ATCC 3584 e PA3679) e *Clostridium perfringens* (NCTC 8798, ATCC 3626, ATCC 3629 e ATCC 3628), obtidas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) pertencente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), além de culturas de *C. sporogenes* isoladas de massas de mortadela resfriada provenientes da Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia de Carnes do Itai (CP5, JP2 e OP2). Para a produção dos esporos dos microrganismos foi empregada a metodologia descrita por MAH et al. (2009).

2.3. Avaliação das propriedades de crescimento de cepas de *C. sporogenes* e *C. perfringens*

2.2.1. Preparo do inóculo

O preparo dos inóculos para os testes de atividade antimicrobiana foi realizado segundo as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias (CLS, 2005). Para tanto, as soluções de esporos foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4mL de solução salina estéril e homogeneizadas em agitador tipo vortex. Alíquotas de 2mL destas suspensões foram tomadas para leitura em espectrofotômetro a 625nm e ajustadas com solução salina estéril para valores de densidade óptica (DO) de 0,08 a 0,10, correspondentes à concentração de 10^8 UFC/mL. Aos 2mL remanescentes das suspensões de esporos, foi adicionado o mesmo volume de solução salina. A partir das soluções padronizadas, procedeu-se à diluição decimal seriada de forma a se obter, ao final da mesma, a concentração de 10^6 UFC/mL. Destas últimas diluições, 6mL foram transferidos para tubos contendo 3mL de caldo BHI, estabelecendo-se uma concentração de 10^5 UFC a 10^6 UFC/mL em 100µL, sendo que nos poços das microplacas inoculados as concentrações resultaram em 10^5 UFC/mL.

2.2.2. Preparo das soluções de compostos antimicrobianos

Para a determinação de atividade antimicrobiana das culturas foram preparadas soluções individuais de cada composto, diluídas em caldo BHI em concentração dupla. Foram avaliados os seguintes compostos e concentrações: ácido acético, cítrico, láctico, málico e tartárico (2,0%, 3,0% e 5,0%); composto à base de ácido propiônico (0,3%, 0,4% e 0,5%, BactoCEASE®, Kemin S.A.); nitrito de sódio (25ppm, 50ppm e 150ppm); eritorbato de sódio (500ppm); eritorbato de sódio (500ppm) suplementado com nitrito de sódio (25ppm, 50ppm e 150ppm); nitrito obtido a partir de extrato de acelga (25ppm, 50ppm e 150ppm nitrito), nitrito obtido a partir de extrato de aipo (25ppm, 50ppm e 150ppm), sorbato de potássio (2,5% e 5,0%) e lactato de sódio (5,0% e 10,0%). A partir dos resultados encontrados na avaliação individual de cada composto antimicrobiano foram formulados *blends* com os compostos que apresentaram resultados promissores e determinada sua atividade antimicrobiana.



Os valores de atividade de água das soluções dos compostos antimicrobianos foram determinados com medidor de atividade de água (modelo Aqualab 4TE, marca Decagon) e o pH foi determinado em pHmetro (modelo DM-21, marca Digimed) com eletrodo tipo penetração.

2.2.3. Preparo da microplaca

Foram usadas nos testes microplacas com 96 poços de fundo chato, com capacidade de 300µL e tampas descartáveis e estéreis. Em cada poço foram adicionados 100µL das soluções dos compostos com atividade antimicrobiana (item 2.2.2). Posteriormente, foram inoculados 100µL de cada suspensão de esporos das linhagens de *C. sporogenes* e *C. perfringens* (item 2.2.1). Como controle positivo foram inoculados 100µL de caldo BHI sem adição do composto testado e 100µL das culturas, enquanto o controle negativo foi preparado com a solução de 100µL dos caldos e 100µL de água deionizada estéril. As microplacas foram incubadas na temperatura de 37°C por 24h em anaerobiose. Os testes foram repetidos duas vezes.

2.2.4. Leitura dos resultados

Após o período de incubação foram adicionados 50µL da solução reveladora de 2,3,5-cloreto de trifêniltetrazólio (TTC) (0,1%) em cada poço e as placas foram reincubadas a 37°C por 2h. A atividade antimicrobiana dos compostos foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da sensibilidade de esporos de *C. sporogenes* e *C. perfringens* a compostos com ação antimicrobiana

As linhagens de *C. sporogenes* e *C. perfringens* mostraram-se sensíveis aos tratamentos aplicados com os ácidos acético, cítrico, láctico, málico e tartárico nas concentrações testadas (Tabela 1). Esses compostos ocasionaram uma redução significativa no pH, com valores que variavam entre 2,20 e 3,85, indicando uma possível ação antimicrobiana destes compostos por meio da redução do pH intracelular. O composto à base de ácido propiônico apresentou desempenho similar aos demais ácidos nas concentrações testadas, porém não ocasionou uma redução tão acentuada dos valores de pH, os quais variaram entre 5,46 e 5,63. A atividade de água das soluções dos ácidos avaliados oscilou entre 0,955 e 0,986, valores encontrados em diversos produtos cárneos cozidos.

A aplicação de ácidos orgânicos tamponados em produtos cárneos com o objetivo de garantir a segurança microbiológica destes alimentos vem sendo estudadas por cientistas de todo o mundo. Um trabalho realizado por SABAH et al. (2003) foi verificada a redução de 1 log UF/g durante o período de resfriamento de 18 horas, após aplicação de 2,0 e 4,8% de citrato de sódio, 2 e 4,8% de lactato de sódio (solução com 60%) e 0,25% de diacetato de sódio em *Roasted beef* reestruturado.



Todos os tratamentos foram tamponados a um pH de 5,6, 5,0 e 4,4. Neste mesmo estudo também foi evidenciado que o uso de citrato de sódio ou lactato de sódio em uma concentração de $\geq 2\%$ inibiu o crescimento de *C. perfringens* ao longo do período de resfriamento de 18 horas.

As linhagens de *C. sporogenes* e *C. perfringens* apresentaram resistência nas concentrações de 2% e 5% de lactato de sódio e sensibilidade na concentração de 10% deste composto (Tabela 1). A aplicação de lactato de sódio não apresentou variações nos valores de pH, sendo que foram encontrados valores entre 6,93 e 6,93. Entretanto, os valores de atividade de água oscilaram entre 0,975 com aplicação de 2% e 0,945 com aplicação de 10%. Esta redução nos valores de atividade de água podem ter contribuído na inibição da germinação dos esporos de *C. sporogenes* e *C. perfringens* na concentração de 10%. A aplicação de concentrações superiores a 3% de lactato de sódio não é recomendada devido ao sabor residual estranho no produto.

A aplicação de sorbato de potássio nas concentrações de 2,5% e 5% não foram capazes de inibir a germinação dos esporos de *C. sporogenes* e *C. perfringens*. Segundo PAREDES-SABJA et al. (2008), o sorbato de potássio pode estimular a germinação dos esporos de *C. sporogenes* e *C. perfringens*, já que o íon potássio um forte germinante para de clostrídios. Neste mesmo estudo, verificou que embora a aplicação de sorbato de sódio em meio de cultura nas concentrações de 0,25% com pH 7,0 tenha mostrado atividade inibitórias contra *C. perfringens*, não foi observado efeito desta aplicação em carne de frango cozida. Portanto, devem ser realizados outros estudos para avaliar o uso destes compostos em produtos cárneos.

As linhagens de *C. sporogenes* e *C. perfringens* apresentaram resistência na concentração de 25ppm de nitrito de sódio e sensibilidade nas concentrações de 50ppm e 150ppm (Tabela 1). Resultados similares foram observados no tratamento com aplicação do nitrito de sódio em conjunto com 500ppm de eritorbato de sódio. Entretanto, no tratamento com aplicação de 500ppm de eritorbato de sódio ambas as culturas apresentaram resistência. É importante ressaltar que o nitrito de sódio é degradado durante o armazenamento, e sua aplicação em produtos cozidos tem a finalidade de realizar o processo de cura e de combater a germinação dos esporos durante as etapas de processamento e cozimento dos produtos.

Em um estudo realizado por JULIATTO (2015) foram elaboradas mortadelas contaminadas artificialmente com esporos de *C. botulinum* e aplicadas as concentrações de 60ppm e 120ppm de nitrito de sódio e sem adição de lactato de sódio. Após o período de armazenamento a 28°C foi observada a produção de toxina botulínica em 6 dias nas amostras com concentração de 60ppm de nitrito de sódio e 26 dias nas amostras com a concentração de 120ppm de nitrito de sódio.



Após a substituição do nitrito de sódio sintético por nitrito de sódio obtido a partir de extratos naturais de aipo e acelga, foi possível observar o mesmo perfil de germinação dos esporos de *C. sporogenes* e *C. perfringens* (Tabela 1). Desta forma, a substituição *in vitro* destes compostos apresentou potencial de inibição similar aos encontrados com o nitrito de sódio sintético. Os extratos naturais são ricos em nitrato de sódio e após um processo de fermentação por bactérias redutoras de nitrato os extratos naturais tornam-se ricos em nitrito de sódio.

Um trabalho realizado por KING et al. (2017) também demonstrou que concentrações equivalentes de nitrito, independentemente da fonte, fornecem inibição semelhante de *C. perfringens* durante o resfriamento. A aplicação de ascorbato potencializa o efeito antimicrobiano do nitrito sobre o *C. perfringens* em concentrações comumente usadas em carnes sem adição de nitrito sintético.

As linhagens de *C. sporogenes* e *C. perfringens* apresentaram sensibilidade aos *blends* adicionados de 2% de lactato de sódio, 500ppm de eritorbato de sódio e 150ppm de nitrito de sódio ou extratos vegetais de aipo ou acelga. Entretanto, estas mesmas linhagens apresentaram resistência aos *blends* quando foi adicionado 50ppm de nitrito de sódio ou dos extratos naturais (Tabela 2). Os *blends* avaliados apresentaram valores de pH entre 6,72 e 6,75 e atividade de água entre 0,967 e 0,968.

Estes resultados indicam que o nitrito de sódio desempenha um importante papel no controle da germinação de *C. sporogenes* e *C. perfringens* quando os valores de atividade de água encontram-se acima de 0,96. Como medida para redução nos níveis de nitrito de sódio, podemos considerar a redução da atividade de água ou aplicação outros métodos de conservação combinados.

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

Estes resultados demonstram que as barreiras de conservação aplicadas em produtos cárneos podem ou não apresentar sinergismo entre si, sendo necessária a aplicação de ferramentas de avaliação destas barreiras em condições onde o controle do patógeno dentro da indústria não seja eficaz.



Tabela 1. Avaliação da atividade microbiana de compostos sobre a germinação de *C. sporogenes* e *C. perfringens*.

Composto	Concentração	Valor de pH	Atividade de água	<i>C. sporogenes</i>							<i>C. perfringens</i>			
				ATCC 19404	ATCC 11437	ATCC 3584	PA 3679	CP5	JP2	OP2	NCTC 8798	ATCC 3626	ATCC 3629	ATCC 3628
Ácido acético	2,0%	3,45	0,979	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	3,0%	3,67	0,978	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	5,0%	3,80	0,977	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ácido cítrico	2,0%	3,22	0,984	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	3,0%	2,74	0,986	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	5,0%	2,66	0,980	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ácido láctico	2,0%	2,88	0,972	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	3,0%	2,94	0,978	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	5,0%	2,65	0,955	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ácido málico	2,0%	2,20	0,982	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	3,0%	3,01	0,980	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	5,0%	2,79	0,980	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ácido tartárico	2,0%	3,12	0,985	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	3,0%	3,66	0,983	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	5,0%	3,85	0,984	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ácido propiônico (composto)	0,3%	5,63	0,981	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	0,4%	5,54	0,982	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	0,5%	5,46	0,984	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R = Resistente; S = Sensível.



Tabela 1. Avaliação da atividade microbiana de compostos sobre a germinação de *C. sporogenes* e *C. perfringens*. (Continuação)

Composto	Concentração	Valor de pH	Atividade de água	C. sporogenes							C. perfringens			
				ATCC 19404	ATCC 11437	ATCC 3584	PA 3679	CP5	JP2	OP2	NCTC 8798	ATCC 3626	ATCC 3629	ATCC 3628
Lactato de sódio	2,0%	6,94	0,975	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	5,0%	6,93	0,966	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	10,0%	6,95	0,945	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Sorbato de potássio	2,5%	6,89	0,980	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	5,0%	7,15	0,973	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Nitrito de sódio	25ppm	6,77	0,984	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	50ppm	6,75	0,985	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	150ppm	6,74	0,987	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritorbato de sódio	500ppm	6,75	0,987	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Nitrito de sódio e Eritorbato de sódio*	25ppm	6,74	0,986	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	50ppm	6,73	0,986	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	150ppm	6,73	0,986	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Extrato de Aipo (extrato fermentado)	25ppm	6,75	0,982	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	50ppm	6,74	0,985	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	150ppm	6,75	0,983	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Extrato de Acelga (extrato fermentado)	25ppm	6,74	0,986	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	50ppm	6,73	0,985	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	150ppm	6,74	0,985	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

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



Tabela 2. Avaliação da atividade microbiana de *blends* de compostos antimicrobianos sobre a germinação de *C. sporogenes* e *C. perfringens*.

Blend	Composto	C	Valor de pH	Atividade de água	<i>C. sporogenes</i>							<i>C. perfringens</i>			
					ATCC 19404	ATCC 11437	ATCC 3584	PA 3679	CP5	JP2	OP2	NCTC 8798	ATCC 3626	ATCC 3629	ATCC 3628
A	Lactato de sódio	2%	6,72	0,967	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Nitrito de sódio	150ppm													
	Eritorbato de sódio	500ppm													
B	Lactato de sódio	2%	6,75	0,968	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Extrato de Aipo	150ppm													
	Eritorbato de sódio	500ppm													
C	Lactato de sódio	2%	6,74	0,968	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	Extrato de Acelga	150ppm													
	Eritorbato de sódio	500ppm													
D	Lactato de sódio	2%	6,72	0,968	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Nitrito de sódio	50ppm													
	Eritorbato de sódio	500ppm													
E	Lactato de sódio	2%	6,75	0,967	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Extrato de Aipo	50ppm													
	Eritorbato de sódio	500ppm													
F	Lactato de sódio	2%	6,74	0,967	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Extrato de Acelga	50ppm													
	Eritorbato de sódio	500ppm													

R = Resistente; S = Sensível.



4. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que vários compostos quando aplicados em concentrações adequadas podem inibir a germinação de *C. sporogenes* e *C. perfringens*. É importante destacar que a aplicação destes compostos combinados em alimentos pode potencializar a ação dos compostos e a inibição da germinação dos esporos destes microrganismos. O conhecimento dos parâmetros de inibição da germinação de microrganismo patogênicos pode levar à adoção de medidas de intervenção para o controle destes em produtos cárneos.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida, ao CTC/Ital pelo estágio e à Fapesp (PDIP – Processo: 17/50349-0) pelo suporte financeiro recebido.

6. REFERÊNCIAS

- ANDERSON, N.M., J.W. LARKIN, M.B. COLE, G.E. SKINNER, R.C. WHITING, L.G.M. GORRIS, A. RODRIGUEZ, R. BUCHANAN, C.M. STEWART, J.H. HANLIN, L. KEENER, P.A. HALL. 2011. Food safety objective approach for controlling *Clostridium botulinum* growth and toxin production in commercially sterile foods. *Journal of Food Protection*. v.74, p.1956–1989.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 272, de 14 de março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 mar. 2019. Seção 1, p. 194.
- BRADBURY, M., GREENFIELD, P., MIDGLEY, D., LI, D., TRAN-DINH, N., VRIESEKOOP, F., BROWN, J.L. 2012. Draft genome sequence of *Clostridium sporogenes* PA 3679, the common non-toxigenic surrogate for proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Bacteriology*. v.194, p.1631-1632.
- BRASIL. Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação Epidemiológica do Botulismo – Brasil. 2014. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/30/Gr-ficos---Botulismo---2.pdf>>. Acesso em 14 de julho de 2020.
- BROWN, J.L., TRAN-DINH, N., CHAPMAN, B. 2012. *Clostridium sporogenes* PA 3679 e seus usos na derivação de programações de processamento térmico para alimentos com baixa acidez estável em prateleiras e como modelo de pesquisa para o proteolítico *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection*. v.75: p.779-792.
- CARTER, A.T., PAUL, C.J., MASON, D.R., TWINE, S.M., ALSTON, M.J., LOGAN, S.M., AUSTIN, J.W., PECK, M.W. 2009. Independent evolution of neurotoxin and flagellar genetic loci in proteolytic *Clostridium botulinum*. *BMC Genomics*. v.10, p.115.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methodology for Sensitivity Tests to Antimicrobial Agents by Dilution for Aerobic Growth Bacteria*. 6ª ed., M7-A6, v.23, n.2, 2005.
- COLLINS, M.D., LAWSON, P.A., WILLEMS, A., CORDOBA, J.J., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.44, p.812–826.
- GLASS, K. A., JOHNSON, E. A. 2004a. Antibotulinal activity of process cheese ingredients. *Journal of Food Protection*. v.67, p.1765–1769.
- GLASS, K. A., JOHNSON, E. A. 2004b. Factors that contribute to the botulinal safety of reduced-fat and fat-free process cheese products. *Journal of Food Protection*. v.67, p.1687–1693.



- GOLDEN, M.C., WANLESS, B.J., DAVID, J.R.D., LINEBACK, D.S., TALLEY, R.J., KOTTAPALLI, B., GLASS, K.A. 2017. Effect of Equilibrated pH and Indigenous Spoilage Microorganisms on the Inhibition of Proteolytic *Clostridium botulinum* Toxin Production in Experimental Meals under Temperature Abuse. *Journal of Food Protection*. v.80(8), p.1252-1258.
- GRASS, J.E., GOULD, L.H., MAHON, B.E. 2013. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010. *Foodborne Pathogens Disease*. v.10(2), p.131–136.
- HAUSCHILD, A. H. W. 1993. Epidemiology of human foodborne botulism. In A. H. W. HAUSCHILD AND K. L. DODDS. 1993. *Clostridium botulinum*: ecology and control in foods. Marcel Dekker Inc., New York.
- IAMARINO, L.Z., OLIVEIRA, M.C., ANTUNES, M.M., OLIVEIRA, M., RODRIGUES, R.O., ZANIN, C.I.C.B. 2015. Nitritos e nitratos em produtos cárneos enlatados e/ou embutidos. *Gestão Foco*. V.7, p.246-51.
- INKSTER, T., CORDINA, C., SIEGMETH A. 2011. Septic arthritis following anterior cruciate ligament reconstruction secondary to *Clostridium sporogenes*; a rare clinical pathogen. *Journal of Clinical Pathology*. v.64, p.820–821. Doi: <<https://doi.org/10.1136/jcp.2010.084434>>.
- JULIATTO, R. 2015. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de especiarias combinados com nitrito de sódio e lactato de sódio na germinação de esporos de *Clostridium sporogenes*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- KING, A.M., GLASS, K.A., MILKOWSKI, A.L., SINDELAR, J., J. 2015. Comparison of the Effect of Curing Ingredients Derived from Purified and Natural Sources on Inhibition of *Clostridium perfringens* Outgrowth during Cooling of Deli-Style Turkey Breast. *Journal of Food Protection*. v.78(8), p.1527-35
- MAH, J. H.; KANG, D. H.; TANG J. Comparison of viability and heat resistance of *Clostridium sporogenes* stored at different temperatures. *Journal of Food Science*, v.74, n.1, p.M23-7, 2009.
- MCCLURE, P.J. 2006. Spore-forming bactéria. In: BLACKBURN, *Food spoilage microorganisms*, v.21. Woodhead Publishing, Sawston, United Kingdom.
- MOYE, Z.; WOOLSTON, J.; SULAKVELIDZE, A. 2018. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. *Viruses*. V.10, p.205.
- NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOODS – NAACMCF. 2010. Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. *Journal of Food Protection*. v.73, p.140–202.
- OKEREKE, A., MONTVILLE, T. J. 1991. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic-acid bacteria. *Journal of Food Protection*. v.54, p.349–353.
- PEREDES-SABJA, D., TORRES, J.A., SETLOW, P., SARKER, M.R., 2008. *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. *Journal of Bacteriology*. v.190, p.1190-1201.
- SABAH, J. R.; THIPPAREDDI, H.; MARSDEN, J. L.; FUNG, D. Y. C. 2003. Use of Organic Acids for the Control of *Clostridium perfringens* in Cooked Vacuum-Packaged Restructured Roast Beef during an Alternative Cooling Procedure. *Journal of Food Protection*. v.66, p.1408-1412. Doi:<<https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1408>>
- SUGIYAMA, H. 1980. *Clostridium botulinum* neurotoxin. *Microbiology Reviews*. ed.44, p.419–448.
- TAYLOR, R.H., DUNN, M.L., OGDEN, L.V., JEFFERIES, L.K., EGGETT, D.L., STEELE, F.M. 2013. Conditions associated with *Clostridium sporogenes* growth as a surrogate for *Clostridium botulinum* in nonthermally processed canned butter. *Journal of Dairy Science*. v.96, p.2754–2764. Doi:<<https://doi.org/10.3168/jds.2012-6209>>.
- TANAKA, N., TRAISMAN, E., PLANTINGA, P., FINN, L., FLOM, W., MESKE, L., GUGGISBERG, J. 1986. Evaluation of factors involved in antibotulinal properties of pasteurized process cheese spreads. *Journal of Food Protection*. v.49, p.526–531.