



AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DA SUBSTITUIÇÃO DE NITRITO DE SÓDIO POR EXTRATOS NATURAIS EM MORTADELA ESTÁVEL EM TEMPERATURA AMBIENTE

Denise Rocha **Gomes**¹, Maria Stella de Azevedo **Gonçalves**², Renata **Bromberg**³,
Anderson de Souza **Sant'ana**⁴, Miriam Gonçalves **Marquezini**⁵

Nº 21213

RESUMO – A demanda dos consumidores por alimentos saudáveis e sem a adição de conservantes químicos tem sido um desafio para a indústria de produtos de origem animal. Neste contexto podemos destacar a substituição de ingredientes sintéticos que possuem comprovada eficácia no controle da germinação e crescimento de bactérias patogênicas por extratos naturais que atendam aos mesmos requisitos de segurança e qualidade nestes produtos. A substituição do sal de cura por extratos vegetais ricos em nitrato ou pré-convertidos a nitrito tem sido uma alternativa para o desenvolvimento de produtos cárneos curados com o apelo clean label. Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar os impactos da substituição do sal de cura por um extrato vegetal comercial na germinação de esporos de *C. sporogenes*. Para tanto, foram elaboradas mortadelas adicionadas de 150 ppm de nitrito sintético ou de extrato vegetal e com valores de atividade de água oscilando entre 0,940, 0,955 e 0,970. As amostras foram armazenadas durante 90 dias a 26 °C ± 1°C. Não foi evidenciado o crescimento de bactérias lácticas (<1,0 log UFC/g) durante a vida útil. Em relação à contagem de clostrídios sulfito redutores, os tratamentos de Cura Tradicional (CT97) e Cura Natural (CN97) apresentaram crescimento de aproximadamente 1 log UFC/g após 15 dias de armazenamento e 2 log UFC/g após 30 dias de armazenamento. Os demais tratamentos permaneceram estáveis durante toda a vida útil. Considerando as condições avaliadas neste estudo, podemos concluir que a substituição do nitrito sintético pelo extrato vegetal não impactou na segurança microbiológica.

Palavras-chaves: *Clostridium botulinum*, nitrito de sódio, extrato natural, mortadela

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Nutrição, UNIP, Campinas-SP; derochag13@gmail.com.

2 Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP.

3 Coorientador: Pesquisador, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas -SP.

4 Colaborador: Pesquisador, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas-SP.

5 Orientador: Assistente de Pesquisa, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP; miriam.marquezini@sp.gov.br.



ABSTRACT – Consumer demand for healthy foods without the addition of chemical preservatives has been a challenge for the animal products industry. In this context, we can highlight the replacement of synthetic ingredients that have proven efficacy in controlling the germination and growth of pathogenic bacteria by natural extracts that meet the same safety and quality requirements in these products. The replacement of curing salt by plant extracts rich in nitrate or pre-converted to nitrite has been an alternative for the development of cured meat products with a clean label appeal. Thus, the objective of this project was to evaluate the impacts of replacing the curing salt with a commercial plant extract on the germination of *C. sporogenes* spores. For this purpose, mortadella added with 150 ppm of synthetic nitrite or plant extract and with water activity values ranging between 0.940, 0.955 and 0.970 were prepared. Samples were stored for 90 days at $26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. There was no evidence of the growth of lactic acid bacteria ($<1.0\text{ log CFU/g}$) during shelf life. Regarding the sulphite reducing clostridia count, the treatments Traditional Cure (CT97) and Natural Cure (CN97) showed growth of approximately 1 log CFU/g after 15 days of storage and 2 log CFU/g after 30 days of storage. The other treatments remained stable throughout their useful life. Considering the conditions evaluated in this study, we can conclude that the replacement of synthetic nitrite by plant extract did not impact microbiological safety.

Keywords: *Clostridium botulinum*, Sodium nitrite, Plant extract, Bologna

1. INTRODUÇÃO

O *C. botulinum* é uma bactéria formadora de esporos e está amplamente distribuída no ambiente. Ela pode ser encontrada em carnes e produtos cárneos, vegetais e produtos à base de leite. Podemos classificar as cepas como proteolíticas (grupo I), as quais produzem toxinas do tipo A, B ou F; seus esporos são altamente resistentes ao calor e capazes de digerir proteínas, requerem um pH mínimo de crescimento de 4,6 e uma temperatura mínima de crescimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob condições ideais (HATHEWAY, 1993; PECK, 2009), e como não proteolíticas (grupo II) que produzem toxinas do tipo B, E e F; e, ao contrário das cepas proteolíticas, elas são incapazes de digerir proteínas, possuem esporos com baixa resistência ao calor e têm a capacidade de crescer em temperaturas mínimas de $3,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (HATHEWAY, 1993; KING et al., 2015a; PECK, 2009).

Como medida preventiva, a indústria de alimentos busca diferentes estratégias de intervenção contra a germinação de esporos de *C. botulinum* e, conseqüentemente, a não produção de toxinas nos alimentos. A esterilização comercial tem sido o processo térmico padrão para o controle de *C. botulinum* em alimentos estáveis em temperatura ambiente (ANDERSON et al., 2011),



entretanto, tal 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; LUND et al., 1974a; NACMCF, 2010; OKEREKE & MONTVILLE, 1991).

O *C. sporogenes* é um microrganismo deteriorante de alimentos (MCCLURE, 2006). Detém forte semelhança fisiológica com o Grupo I (proteolítico) do *C. botulinum* e é amplamente utilizado como substituto para esse organismo para demonstrar 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). É importante ressaltar que a formação da toxina botulínica é usada para diferenciar as cepas do Grupo I de *C. botulinum* e *C. sporogenes* (BROWN et al., 2012). No Brasil, devido a determinação da ANVISA sobre a indisponibilidade de comercialização de linhagens de *C. botulinum* e pela ausência de um laboratório de testes de desafio de alimentos com nível de segurança NB-3, opta-se pelo emprego da cepa de *Clostridium sporogenes* na avaliação da eficácia de alimentos e processos.

Recentemente foram realizados estudos usando nitrito de sódio derivado de uma fonte de rótulo limpo, o aipo e/ou a acelga. Este produto é obtido pela fermentação do suco de aipo e/ou acelga com uma cultura *starter* conhecidamente redutora de nitrogênio. A cultura mais usada pela indústria de insumos desta categoria hoje é o *Staphylococcus carnosus*, o qual converte o nitrato presente no suco de aipo e/ou acelga em nitrito (SEBRANEK et al., 2012; TERNS et al., 2011).

Nos últimos anos é observada a elevada demanda dos consumidores por alimentos de alta qualidade, frescos e sem conservantes artificiais (DAVID, 2013). Para atender esta demanda dos consumidores, as formulações visam avaliar a substituição destes compostos com a aplicação de um ingrediente *clean label*. Este estudo foi desenvolvido para avaliar o efeito de um ingrediente de etiqueta limpa, especificamente de nitrito derivado de extratos naturais, na inibição da germinação de *C. sporogenes* inoculado artificialmente em mortadela estável em temperatura.



2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Produção de esporos

A partir das culturas de esporos de *C. sporogenes* (PA3679, ATCC3584 e ATCC11437) foi transferida uma alíquota de 1 mL da cultura ativa em 10 mL de caldo TPGY (50 g triptona, 20 g extrato de levedura, 5 g peptona, 6 g dextrose e 1 g tioglicolato de sódio, em 1 L de água destilada), seguida de incubação em anaerobiose a 35 °C por 48 h. Após a incubação, foi transferida uma alíquota de 10 mL deste caldo para 100 mL de caldo TPGY e estes foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. A seguir, uma alíquota de 10mL deste caldo foi inoculada em 1 L de caldo TPGY e esse foi incubado nas mesmas condições. A cultura foi centrifugada a 14.000 RPM, a 4 °C, por 10 min, seguida por três lavagens sucessivas em solução salina a 0,85 %. O precipitado foi ressuspensionado em 100mL do meio de esporulação (60 g triptona, 1 g dextrose e 1 g de tioglicolato de sódio suplementado com 5 g carbonato de cálcio em 1 L de água destilada, pH 5,0) e, em seguida, este foi incorporado em 900mL de meio de esporulação e incubado sob anaerobiose a 35 °C por 10 dias. Em seguida, realizou-se outra centrifugação nas mesmas condições já descritas e o precipitado foi ressuspensionado em solução tampão (Na_2HPO_4 5.675 g, KH_2PO_4 3,63 g em 1 L de água destilada, pH 7,0). A solução de esporos foi submetida a choque-térmico a 80 °C por 10 min, no qual se removeu as células vegetativas presentes (MAH et. al, 2009). A concentração da solução de esporos foi determinada pela contagem de clostrídios sulfito redutores (APHA, 2015).

2.2. Processamento do lote experimental

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

2.2.1. Caracterização das matérias-primas

Para a caracterização das matérias-primas foram realizados os ensaios de cinzas (BRASIL, 2019), umidade (BRASIL, 2019), proteína (BRASIL, 2019) e gordura (BRASIL, 2019), *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2, 2017), bactérias lácticas (ISO 13721, 1996), clostrídios sulfito redutores (SALFINGER & TORTORELLO, 2015), esporos de clostrídios sulfito redutores (SALFINGER & TORTORELLO, 2015), *Clostridium perfringens* (ISO 7937, 2004) e estafilococos coagulase positiva (ISO 6888-1, 2018).



2.2.2. Processamento das amostras de mortadela

Neste estudo trabalhamos com uma única concentração de nitrito de sódio adicionado (150 ppm) e acelerador de cura (500 ppm), e com três condições de atividade de água sendo: 0,94, limite mínimo para inibição da germinação e crescimento de *C. botulinum*; 0,970, valor considerado de risco para a germinação e crescimento de *C. botulinum* e 0,955 atendendo aos parâmetros definidos no ofício circular n.º 005/2015/CGI/DIPOA/DAS (BRASIL, 2015) para produção de mortadelas estáveis em temperatura ambiente. Desta forma, as amostras de mortadela foram elaboradas na planta piloto do CTC/Ital e foram produzidos seis tratamentos, sendo eles: CT94: nitrito de sódio (cura tradicional); atividade de água 0,940; CT95: nitrito de sódio (cura tradicional); atividade de água 0,955; CT97: nitrito de sódio (cura tradicional); atividade de água 0,970; CN94: extrato vegetal (cura natural); atividade de água 0,940; CN95: extrato vegetal (cura natural); atividade de água 0,955; CN97: extrato vegetal (cura natural); atividade de água 0,970;

Tabela 1. Formulação das amostras com a cura tradicional e natural.

Matérias-primas / Ingredientes	Cura Tradicional		Cura Natural	
	%	g	%	g
CMS frango	60,00	9000	60,00	9000
Retalho suíno	15,20	2280	14,16	2280
Fígado suíno	1,00	150	1,00	150
Rim suíno	1,00	150	1,00	150
Gel de pele suína crua (2:1)	12,00	1800	12,00	1800
Proteína texturizada de soja	3,50	525	3,50	525
Fécula mandioca	5,00	750	5,00	750
Sal	*	*	*	*
Açúcar	0,60	90	0,60	90
Condimento mortadela	1,00	150	1,00	150
Fosfatos	0,50	75	0,50	75
Extrato vegetal (a base de aipo)	-	-	1,00	150
Sal de cura (90% de sal e 10% de nitrito)	0,15	22,5	-	-
Acerola	-	-	0,24	36
Eritorbato de sódio	0,05	7,5	-	-
TOTAL	100	15000	100	15000

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

As matérias-primas cárneas congeladas foram quebradas em quebrador de blocos, e após foram moídas com o CMS em discos de 16 mm. A massa cárnea, a CMS, os miúdos e o gel de pele foram transferidos para o *cutter* e homogeneizadas. Aproximadamente 50 % da massa cárnea foi inoculada, por meio da técnica de aspersão (*spray*), com a solução de esporos de *C. sporogenes* (3 log UFC/g) e os demais 50 % de massa cárnea não inoculadas com os esporos desta bactéria foram usadas como controle dos testes. Foram adicionados o fosfato, o sal de cura e/ou o extrato vegetal, o condimento, a proteína texturizada de soja, a fécula de mandioca e o açúcar e a mistura foi submetida a homogeneização para formação de uma emulsão.



Uma alíquota da massa de cura tradicional e uma outra de cura natura foram retiradas e foi determinada a umidade (% UR) por metodologia rápida (microondas) segundo Pettinati (1975), onde foi possível obter os cálculos para ajustar a atividade de água (A_w) de cada tratamento, através da adição de NaCl, conforme a equação de Krispien, Rodel e Leistner (1979) modificada (Tabela 2).

Tabela 2. Valores adicionados de cloreto de sódio na massa cárnea após ajuste de A_w .

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

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

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

2.3. Análises físico-químicas

Após 24 horas de armazenamento, três amostras de mortadela de cada tratamento foram selecionadas para a realização dos ensaios de umidade (BRASIL, 2019b), proteína (BRASIL, 2019b), gordura (BRASIL, 2019b), carboidratos (BRASIL, 2019b), cinzas (BRASIL, 2019b), atividade de água (BRASIL, 2019b), pH (BRASIL, 2019b), nitrito de sódio (BRASIL, 2019b) e nitrato de sódio (BRASIL, 2019b). Os ensaios de nitrito de sódio (BRASIL, 2019b) e nitrato de sódio (BRASIL, 2019b) também foram acompanhados durante a vida útil dos produtos.

2.4. Análises microbiológicas

Após 24 horas de armazenamento, três amostras de mortadela de cada tratamento foram selecionadas para a realização dos ensaios de *Salmonella* spp. (ISO 6579-1, 2020), *Escherichia coli* (ISO 16649-2, 2001), *Clostridium perfringens* (ISO 7937, 2004) e estafilococos coagulase positive (ISO 6888-1, 2018) conforme preconizados na Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019 (BRASIL, 2019c). No 1º, 15º, 30º, 45º, 60º, 75º e 90º dia de armazenamento foram realizados os ensaios microbiológicos de bactérias lácticas (ISO 13721, 1996) e clostrídios sulfito redutores (SALFINGER & TORTORELLO, 2015). Os ensaios foram realizados em triplicata de amostras e os resultados expressos em log UFC/g.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das matérias-primas

Os resultados da caracterização das matérias-primas estão descritos nas Tabelas 3 e 4.

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

Tabela 3. Caracterização físico-química das matérias-primas

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

* Resultado médio de triplicata de amostras; letras minúsculas diferentes apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05)

Ao avaliar a Tabela 4, nota-se a presença de clostrídios sulfito redutores, seja na forma vegetativa ou esporulada, nas amostras de CMS, gel de pele, fígado e carne suína. Este resultado indica que a qualidade da matéria-prima pode influenciar na prevalência de esporos de clostrídios nas massas de mortadela. Cabe ressaltar que o tratamento térmico aplicado durante o cozimento da mortadela (75 °C) não é suficiente para inativar os esporos de clostrídios. Desta forma, a aplicação de barreiras de inibição da germinação destes esporos durante a vida útil do produto é fundamental para a manutenção da segurança desta categoria de produtos.

Tabela 4. Caracterização microbiológica das matérias-primas

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

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

3.2. Caracterização físico-química da mortadela

Os resultados da caracterização físico-químicas das amostras de mortadela encontram-se descritos nas Tabelas 5 e 6.



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021
01 a 02 de setembro de 2021
ISBN 978-65-994972-0-9

Ao avaliar a Tabela 5 podemos verificar que as amostras de mortadela apresentaram valores médios de 14% de proteína, 14% de gordura, 5,8% de carboidratos. Estes resultados encontram-se de acordo o regulamento técnico de identidade e qualidade de mortadela (BRASIL, 2000; BRASIL, 2011).

Tabela 5. Caracterização físico-química em amostras de mortadela após 24 h do processamento.

Tratamentos	Resultado (g/100g)*				
	Umidade	Proteína	Gordura	Carboidratos	Cinzas
CT94	57,90±0,04 ^b	14,61±0,02 ^a	14,71±0,05 ^a	5,76±0,01 ^a	6,20±0,01 ^a
CT95	58,45±0,06 ^{ab}	14,65±0,04 ^a	14,77±0,08 ^a	5,82±0,01 ^a	5,33±0,00 ^a
CT97	59,55±0,04 ^a	14,70±0,03 ^a	14,80±0,07 ^a	5,79±0,00 ^a	3,52±0,01 ^b
CN94	57,92±0,05 ^b	14,62±0,01 ^a	14,76±0,06 ^a	5,80±0,02 ^a	6,21±0,00 ^a
CN95	58,42±0,08 ^{ab}	14,60±0,00 ^a	14,75±0,02 ^a	5,81±0,03 ^a	5,30±0,01 ^a
CN97	59,55±0,02 ^a	14,66±0,04 ^a	14,81±0,05 ^a	5,78±0,00 ^a	3,55±0,01 ^b

* Resultado médio de triplicata de amostras; letras minúsculas diferentes apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05)

Podemos verificar na Tabela 6 que os valores de atividade de água alvo durante o planejamento experimental foram concretizados. Os tratamentos que tinham como alvo a atividade de água 0,940 apresentaram valores médios de 0,944, enquanto que as amostras com valor alvo de 0,970 tiveram valores médios de 0,971. Este parâmetro é importante para avaliar o comportamento dos esporos de *C. sporogenes* em condições de atividade de água que permitem ou inibem a sua germinação. Assim, a avaliação da fonte de nitrito pode ser avaliada e verificada a sua equivalência quanto a segurança microbiológica do produto.

Em relação aos valores de pH (Tabela 6), os quatro tratamentos apresentaram valores entre 5,88 e 6,04, valores estes considerados normais para mortadela. Este resultado indica que o extrato natural não promove alterações nos valores de pH da mortadela.

Tabela 6. Valores de atividade de água e pH em amostras de mortdela após 24 h do processamento.

Tratamentos	Atividade de água*	pH*
CT94	0,944±0,001 ^c	6,31±0,01 ^a
CT95	0,953±0,000 ^b	6,32±0,01 ^a
CT97	0,971±0,000 ^a	6,33±0,01 ^a
CN94	0,944±0,001 ^c	6,35±0,02 ^a
CN95	0,954±0,000 ^b	6,39±0,00 ^a
CN97	0,971±0,000 ^a	6,35±0,01 ^a

* Resultado médio de triplicata de amostras; letras minúsculas diferentes apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05)

3.2. Vida útil

Os valores de residual de nitrito e nitrato de sódio são apresentados nas Figuras 1 e 2 e os resultados microbiológicos são apresentados nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

As amostras de mortadela elaboradas com a cura tradicional apresentaram valores médios de residual de nitrato de sódio de aproximadamente 0,0002 g / 100 g. Este resultado está de acordo considerando o tipo de sal de cura que foi usado no processamento das amostras, sendo que este ingrediente tinha em sua composição cloreto de sódio (90 %) e nitrito de sódio (10 %) e com o fato de que em produtos cárneos curados, uma boa quantidade de nitrito adicionado é oxidada a nitrato por enzimas oxidases. Portanto, residuais de nitrato de sódio em torno de 0,0002 a 0,0005 g / 100g são normalmente encontrados em produtos adicionados somente de nitrito de sódio (FEINER, 2016).

Na Figura 2 são apresentados os resultados de nitrato de sódio residual nas amostras de mortadela elaboradas com a cura natural. Destaca-se que os níveis residuais médios encontram-se entre 0,0055 e 0,0056 g /100g durante todo o período de vida útil do produto. Este fator pode estar relacionado com a ausência do crescimento de bactérias que possuem a capacidade de conversão do nitrato de sódio a nitrito de sódio, as chamadas bactérias nitrificantes. Dentre as bactérias nitrificantes podemos destacar as bactérias lácticas, as quais também são consideradas de importância dentro do perfil de deterioração de produtos curados. Como as mortadelas passaram por uma etapa de cozimento (75°C) e estas bactérias possuem forma vegetativa, estima-se que as bactérias lácticas foram inativadas durante o cozimento e, como este produto não é passível de manipulação após o cozimento, não houve a contaminação cruzada por estes microrganismos. Sendo assim, considera-se que estes valores residuais de nitrato de sódio estão de acordo.

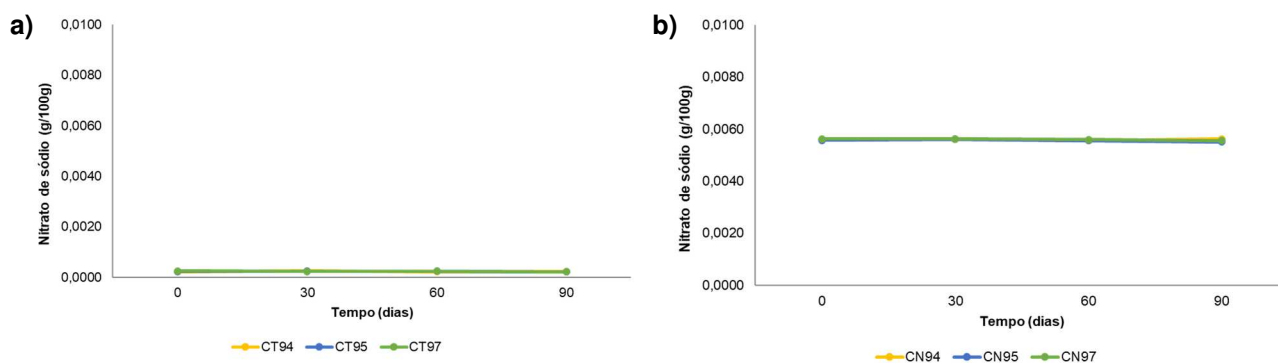


Figura 2. Valores médios de nitrato de sódio (g / 100 g) em mortadelas elaboradas com: **a)** cura natural e **b)** cura tradicional durante o armazenamento a 26 °C ± 1 °C durante 90 dias.

Todas as amostras de mortadela analisadas apresentaram valores residuais de nitrito de sódio de aproximadamente 0,0055 g/100g após 24h de armazenamento a 26 °C ± 1 °C. Após 15 dias de armazenamento, estes valores já estavam na ordem de 0,0010 g/100g e no 90º dia de armazenamento atingiram a faixa entre 0,0002 e 0,0005 g/100g. De acordo com Robach et al (1978), a combinação de 40 ppm de nitrito e 0,2% de ácido ascórbico é superior em relação a inibição da germinação de esporos de *C. botulinum* quando comparado a adição de 156 ppm de nitrito

No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada nº 272 de 14 de março de 2019 preconiza valores residuais máximos de nitrito em 0,015 g / 100g e a soma dos nitritos e nitratos, determinados como quantidade máxima residual, não deve superar 0,015 g / 100 g, expressa como nitrito de sódio (BRASIL, 2019a). Desta forma, a aplicação de 150 ppm de nitrito de sódio nos produtos foi adequada para atender ao regulamento nacional.

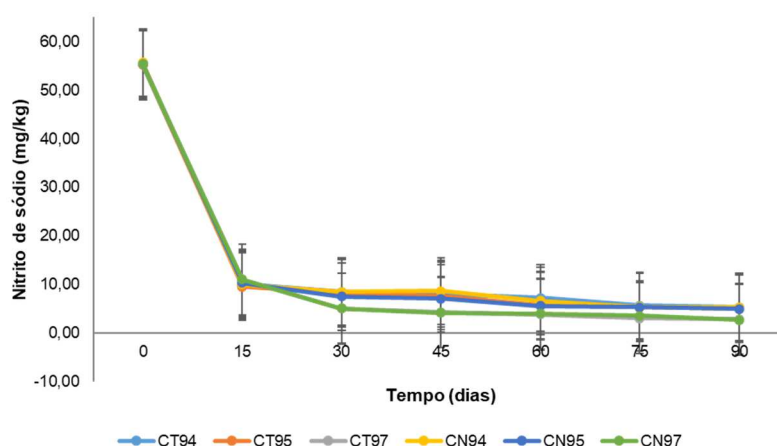


Figura 3. Valores médios de nitrito de sódio (g / 100 g) em mortadelas elaboradas com cura tradicional e cura natural durante o armazenamento a 26 °C ± 1 °C durante 90 dias.

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

Ao observar a Figura 3, podemos notar que os tratamentos CT97 e CN97 foram os únicos tratamentos que permitiram a germinação dos esporos de *C. sporogenes* durante a vida útil ($p < 0,05$). Assim, podemos verificar que a barreira da atividade de água também exerce um papel fundamental em relação a segurança microbiológica deste produto durante a vida útil. Em relação ao extrato natural, podemos verificar que as amostras elaboradas com a cura natural tiveram seu comportamento similar às amostras elaboradas a partir da cura tradicional.

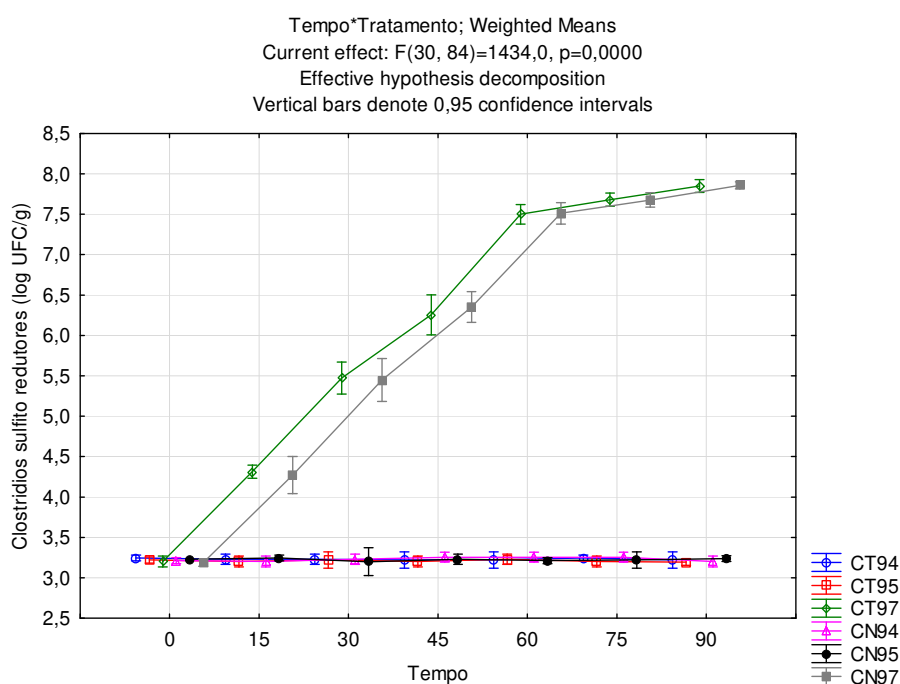


Figura 3. Valores médios da contagem de clostrídios sulfito redutores em mortadelas elaboradas com cura tradicional e cura natural durante o armazenamento a $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 dias.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que a substituição da cura tradicional pela cura natural, dentro dos parâmetros avaliados neste estudo, não impacta na segurança microbiológica de mortadelas estáveis em temperatura ambiente.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida.



6. REFERÊNCIAS

- ABERLE E.D.; FORREST, J.C.; GERRARD, D.E.; MILLS, E.W.; HEDRICK, H.B.; JUDGE, M.D.; MERKEL, R.A. 2001. **Principles of meat science**. 4th ed. Dubuque, Iowa: Kendall/Hunt
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.º 4 de 31 de março de 2000. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de carne mecanicamente separada, de mortadela, de linguiça e de salsicha. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 5 abr. 2000, seção 1, 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício-circular nº 005/2015/CGI/DIPOA/SDA. **Informações sobre registro do produto mortadela conservada em temperatura ambiente**. Brasília, 27 de julho de 2015.
- BRASIL. Agência nacional de vigilância sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 272, 14 de março de 2019. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 18 de mar. 2019. 2019, seção 1, 2019a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. 2th ed. Brasil 2019. Brasília, DF: MAPA 2019b. 158.
- BROWN, C.L.; HEDRICK, H.B.; BAILEY, M.E. 1974. Characteristics of cured ham as influenced by levels of sodium nitrite and sodium ascorbate. **Journal of Food Science**. v.39, p.977–979
- DJERI, N. & WILLIAMS, S. K. Celery juice powder used as nitrite substitute in sliced vacuum-packaged turkey bologna stored at 4°C for 10 weeks under retail display light. **Journal of Food Quality**. 2014. v.37, p.361–370. Doi: 10.1111/jfq.12102.
- FEINER, G. **Meat products handbook: Practical science and technology**. Woodhead Publishing, Cambridge. 2006. p.671.
- GRAY, J.I.; MACDONALD, B.; PEARSON, A.M.; MORTON, I.D. 1981. Role of nitrite in cured meat flavor: a review. **Journal of Food Protection**. v.44, p.302–312.
- HOWE, J.L.; GULLETT, E.A; USBORNE, W.R. Development of pink color in cooked pork. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**. 1982. v.15, p.19–23.
- PEARSON, A.M. & TAUBER, F.W. **Processed meats**. 2th ed. New York: Van Nostrand Reinhold. 1984.
- ROBACH, M.C.; IVEY, F.J., HICKEY, C.S. System for evaluating clostridial inhibition in cured meat products. **Applied Environmental Microbiology**. 1978, v.36, .210-211.
- SALFINGER, Y., and TORTORELLO, M.L.. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 5th ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2015.p.995.
- SEBRANEK, J.G. & FOX, J.B. 1985. A review of nitrite and chloride chemistry: interactions and implications for cured meats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.36, p.1169–1182
- VASAVADA, M.N. & CORNFORTH, D.P. 2005. Evaluation of milk mineral antioxidant activity in meat balls and nitrite-cured sausage. **Journal of Food Science**. v.70, p.250–253.

Revisão ortográfica

A responsabilidade pela revisão ortográfica do resumo expandido é dos autores.