



## **EFEITO DA CURA NATURAL NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE *Clostridium perfringens* DURANTE O RESFRIAMENTO PROLONGADO EM MODELO CÁRNEO**

Letícia Leal **Lemos**<sup>1</sup>, Maria Stella de Azevedo **Gonçalves**<sup>2</sup>, Márcia Mayumi Harada **Haguiwara**<sup>3</sup>,  
Renata **Bromberg**<sup>4</sup>, Míriam Gonçalves **Marquezini**<sup>5</sup>

**Nº 22215**

**RESUMO** – Para controlar o crescimento de *C. perfringens* em produtos cárneos curado cozidos, as indústrias de carnes e aves geralmente seguem os parâmetros de estabilização descritos nos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ) dos produtos ou referências indicadas nos RTIQ. Entretanto, algumas falhas de processo podem ocorrer e a avaliação da segurança destes produtos deve ser realizada para garantir o destino correto dos mesmos produtos. Neste sentido, o sal nitrito atua como uma barreira adicional no controle da germinação dos esporos de *C. perfringens*, contudo, não existem modelos matemáticos que consideram o uso de nitrito proveniente de extratos vegetais em substituição à cura tradicional. Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar os efeitos de três temperaturas de resfriamento em um modelo cárneo não curado (NC), curado com nitrito sintético (CT) e curado com nitrito obtido de extrato vegetal de aipo (CN) no potencial de crescimento de *C. perfringens*. Para tanto, foram elaborados modelos cárneos adicionados com 150 ppm de nitrito ou de extrato vegetal à base de aipo. As amostras foram tratadas termicamente até atingir 72 °C no interior do produto e foram resfriadas em três condições de temperatura (-4 °C, 5 °C e 10 °C). Os modelos cárneos do tratamento NC apresentaram crescimento de *C. perfringens* em todas as temperaturas de resfriamento, enquanto os tratamentos CT e CN apresentaram crescimento de *C. perfringens* somente no resfriamento a 10 °C. Este resultado comprova a importância do nitrito, independentemente da fonte de origem, para o controle da germinação e crescimento de *C. perfringens*.

**Palavras-chaves:** *Clostridium perfringens*, resfriamento, produtos cárneos curados, extrato natural

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, PUC-Campinas, Campinas-SP; leticia.lemos03@gmail.com

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

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

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

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



**ABSTRACT** – *To control the growth of *C. perfringens* in cooked cured meat products, the meat and poultry industries generally follow the stabilization parameters described in the Technical Regulations for Identity and Quality (RTIQ) of the products or references indicated in the RTIQ. However, some process failures may occur and the safety assessment of these products must be carried out to ensure the correct destination of these products. In this sense, nitrite acts as an additional barrier to control the germination of *C. perfringens* spores, however, there are no mathematical models considering the use of nitrite from plant extracts to replace traditional curing. Thus, the objective of this project was to evaluate the effects of three cooling temperatures in an uncured meat model (NC), cured with synthetic nitrite (CT) and cured with nitrite obtained from celery juice (CN) on the growth potential of *C. perfringens*. For this purpose, meat models added with 150 ppm of nitrite or celery juice were prepared. The samples were heat treated until reaching 72 °C inside the product and were cooled in three temperature conditions (-4 °C, 5 °C and 10 °C). The meat models from the NC treatment showed growth of *C. perfringens* at all cooling temperatures, while the CT and CN treatments showed growth of *C. perfringens* only at cooling to 10 °C. This result proves the importance of nitrite, regardless of the source of origin, for the control of germination and growth of *C. perfringens*.*

**Keywords:** *Clostridium perfringens, cooling, cured meat products, plant extract*

## 1. INTRODUÇÃO

O *Clostridium perfringens* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia e formadora de esporos. Seus esporos são frequentemente encontrados de forma ubíqua no ambiente, incluindo o solo, a água e no intestino de animais. Este patógeno representa a terceira principal causa de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo e afeta aproximadamente 1 milhão de pessoas por ano (CDC, 2012; JUNEJA et al., 2006; REDONDO-SOLANO et al., 2013; SCALLAN et al., 2011). A toxinfecção causada por *C. perfringens* ocorre quando uma elevada dose infectante, 6 log UFC/g, é ingerida a partir de alimentos contaminados. A doença causada por este patógeno inclui dor abdominal, câimbra e diarreia, sendo a última causada pela liberação de enterotoxinas durante a esporulação das células vegetativas ingeridas devido às condições encontradas no trato gastrointestinal do hospedeiro (USDA, 2012).

Como medida preventiva ao *C. perfringens*, a indústria de alimentos busca diferentes estratégias de intervenção contra a germinação de esporos e o crescimento de clostrídios. A esterilização comercial tem sido o processo térmico padrão para o controle de esporos de clostrídios em alimentos estáveis em temperatura ambiente (ROBACH; IVEY; HICKEY, 1978), entretanto, este processo térmico pode danificar as características físicas e sensoriais de algumas categorias de alimentos. Para produtos cárneos, por exemplo, é recomendada a aplicação de processos de cozimento com temperaturas de 75 °C, sendo necessário que o centro do produto atinja 72 °C. As condições de temperatura entre 70 °C e 80 °C inativam as células vegetativas, porém também podem auxiliar na germinação dos esporos (CRAVEN &



BLANKENSHIP, 1985). Desta forma, os desafios de segurança alimentar podem surgir com base no tempo em que os produtos permanecem dentro da faixa de temperatura de crescimento de *C. perfringens* (12° a 50°C) durante o resfriamento. No intervalo de temperatura entre 43°C e 47°C, as células vegetativas de *C. perfringens* possuem tempo de geração inferior a 10 min (ICMS, 1996). Assim, quando as temperaturas de resfriamento não são adequadamente controladas em produtos prontos para o consumo (*Ready to Eat* – RTE), há um potencial risco de aumento no número de células vegetativas de *C. perfringens* (SCHRODER & BUSTA, 1971).

O nitrito de sódio é um ingrediente usado em produtos cárneos processados para conferir cor e sabor de curados, controlar a oxidação e inibir a germinação de esporos de clostrídios quando usado em conjunto com aceleradores de cura (JUNEJA et al., 2010). O eritorbato de sódio e o ascorbato de sódio são os principais acelerados de cura usados em produtos cárneos curados. Estes compostos atuam como agentes redutores e elevam a taxa de conversão do nitrito em óxido nítrico, aumentando assim o desenvolvimento da cor curada característica nestes produtos (SAUTER et al., 2006) e a eficácia do nitrito no controle da germinação de clostrídios (KING et al., 2015a; KING et al., 2015b; SAUTER et al., 2006)

A concentração de nitrito e dos acelerados de cura aplicados em produtos cárneos pode variar amplamente dependendo da categoria de produto e do tipo de processamento. No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 272, de 14 de março de 2019, que estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos, preconiza para produtos cárneos industrializados cozidos o limite máximo residual de 0,015 g/100g de nitrito, 0,03 g/100g de nitrato e a soma dos nitritos e nitratos, expressa como nitrito de sódio, não deve superar 0,015g/100g. Em relação aos acelerados de cura, ou antioxidantes, essa legislação preconiza *quantum satis* para o eritorbato ou o ascorbato (BRASIL, 2019a). Dentre os produtos cárneos curados, a maioria contém os limites máximos preconizados na legislação, entretanto, com o uso de extratos naturais como alternativa ao nitrito sintético e aos aceleradores de cura para a elaboração de produtos cárneos curados. É importante destacar que independentemente da fonte do nitrito ou do acelerador de cura, a combinação da concentração de ambos os ingredientes determina a ação antimicrobiana em *C. perfringens* (KING et al., 2015a).

Considerando os impactos do controle de temperatura e da concentração de nitrito na germinação e no crescimento de *C. perfringens*, o *Food Safety Inspection Service* (FSIS) do USDA elaborou um guia com orientações para a indústria de produtos cárneos prontos para o consumo atender aos padrões de desempenho para resfriamento nesta categoria de produto (USDA, 2019). Embora os parâmetros do processo de resfriamento estejam definidos e as empresas busquem atender estes requisitos, algumas falhas durante o resfriamento podem ocorrer. Quando estes parâmetros não são atendidos, uma avaliação de segurança do produto deve ser realizada para estabelecimento do destino dos produtos. Esta avaliação pode ser realizada através da coleta de dados de tempo e de temperatura do processo, assim como os requisitos de segurança do produto. Estas informações são inseridas em programas de modelagem de crescimento bacteriano para avaliar o potencial de crescimento de *C. perfringens*. Os

modelos disponíveis contêm fatores de tempo, temperatura e formulação para prever o crescimento de *C. perfringens*, entretanto, esses modelos não cobrem todos os cenários possíveis (MOHR et al, 2015).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de três temperaturas de resfriamento em um modelo cárneo não curado, curado com nitrito sintético e curado com nitrito obtido de extrato vegetal de aipo no potencial de crescimento de *C. perfringens*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Produção de esporos

O método selecionado para a esporulação das culturas de *C. perfringens* foi descrito por JUNEJA et al. (1993). As culturas de *C. perfringens* (NCTC 8798, ATCC 3626, ATCC 3628 e ATCC 3629) foram selecionadas para a esporulação e testes neste estudo. A solução de esporos foi submetida a choque-térmico a 80 °C por 10 min, no qual se removeu as células vegetativas presentes. A concentração da solução de esporos foi determinada pela contagem de clostrídios sulfito redutores (SALFINGER & TORTORELLO, 2015).

### 2.2. Processamento do lote experimental

Para avaliar o impacto do resfriamento e da cura natural no crescimento de *C. perfringens* foi necessário usar um modelo cárneo que não oferecesse barreiras que pudessem inibir a germinação e o crescimento deste microrganismo e, conseqüentemente, interferir nos resultados do teste. Para tanto, uma formulação básica contendo carne suína moída, nitrito de sódio e/ou extrato vegetal e eritorbato de sódio e/ou extrato de acerola foi usado para produção do lote experimental. O extrato vegetal (a base de aipo) e o extrato de acerola usados neste experimento são comerciais e foram disponibilizados por uma empresa de ingredientes parceira.

#### 2.2.1. Processamento das amostras de mortadela

O processamento das amostras foi realizado nas dependências do Laboratório de Testes de Desafio (LTD) do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC), pertencente ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (Ital) no período entre março e maio de 2022. Para a elaboração dos modelos cárneos foram produzidos três tratamentos, sendo eles: **Não Curado (NC)**, sem adição de nitrito e acelerador de cura; **Cura Tradicional (CT)**, adicionado de nitrito de sódio e eritorbato de sódio; e **Cura Natural (CN)**, adicionado de extrato vegetal de aipo fermentado rico em nitrito e extrato de acerola. Neste estudo trabalhamos com uma única concentração de nitrito de sódio (150 ppm) e acelerador de cura (500 ppm).

**Tabela 1.** Formulação do modelo cárneo.

Matérias-primas / Ingredientes	Tratamentos					
	NC		CT		CN	
	%	g	%	g	%	g
Pernil suíno	100	5000	99,8	4990	98,76	4938
Sal de cura (90% de sal e 10% de nitrito)	-	-	0,15	7,5	-	-
Eritorbato de sódio	-	-	0,05	2,5	-	-
Extrato vegetal (a base de aipo)	-	-	-	-	1,00	50
Extrato de acerola	-	-	-	-	0,24	12
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>5000</b>	<b>100</b>	<b>5000</b>	<b>100</b>	<b>5000</b>

NC: Não curado; CT: Cura Tradicional; CN: Cura Natural; %: porcentagem; g: gramas.

O pernil suíno congelado foi quebrado em quebrador de blocos e moído em disco de 16 mm. Aproximadamente 50 % da carne moída foi inoculada, por meio da técnica de aspersão (*spray*), com a solução de esporos de *C. perfringens* (3 log UFC/g). Os 50 % de carne moída não inoculadas com os esporos desta bactéria foram usados como controle dos testes. O sal de cura, o eritorbato de sódio, o extrato vegetal a base de aipo e o extrato de acerola foram adicionados aos tratamentos conforme descrito na Tabela 1. Os tratamentos foram embutidos em envoltório plástico impermeável e encaminhados para o cozimento em forno combinado (Rational Combimaster Plus).

### 2.3. Cozimento, resfriamento e amostragem

A estufa foi programada para as seguintes condições (tempo x temperatura): 30 min a 60 °C; 60 min a 70 °C; e 84 °C até atingir 73 °C no interior do produto. Após o cozimento, os produtos provenientes de cada tratamento foram divididos em três lotes e cada lote foi resfriado em câmara fria em uma temperatura específica (-4 °C, 5 °C e 10°C) até que o interior do produto atingisse 10°C. Esta temperatura foi selecionada como um controle de estabilização final do produto durante o resfriamento considerando a maior temperatura avaliada durante o resfriamento dos produtos (10 °C) e faixa de temperatura de crescimento de *C. perfringens* (12° a 50°C) durante o resfriamento.

Com base na curva de cozimento do tratamento **Não Curado (NC)** foi estimada a intensidade da pasteurização e seu potencial na destruição de formas vegetativas de microrganismos, adotando-se a cinética de morte de 1ª ordem. Para tanto, foi utilizada a resistência térmica do *Streptococcus* do grupo D (*Enterococcus faecalis*) como microrganismo-alvo, tendo como referência a temperatura de 70 °C, valor *z* igual a 10 °C e valor de  $D_{70} = 2,95$  min (FEINER, 2006).

A equação de Patashnik foi empregada para fins de cálculo (GONÇALVES & GERMER, 1992):

$$P_{70} = \Delta t [(L_1 + L_2 + L_3 + ..... + (L_{n-1}))] \quad (\text{Equação de Patashnik})$$

Onde:

$P_{70}$  = intensidade de pasteurização (em min) na temperatura de referência.

$\Delta t$  = intervalo regular de tempo (em minutos) em que o produto permanece a uma dada temperatura interna durante o processamento térmico.

$L$  = taxa letal em cada intervalo regular de tempo =  $10^{(T-T_{ref})/Z}$ .

$T$  = temperatura interna medida no local de aquecimento mais lento do produto.

$T_{ref}$  = temperatura de referência adotada para o cálculo de pasteurização.

$Z$  = número de graus Celsius que ocasiona variação de dez vezes no efeito de pasteurização (10°C).

O cálculo da redução do número de ciclos log foi feito usando a seguinte equação (FEINER, 2006):

$$P_{70} = D_{70} (\log N_0 - \log N)$$

Onde:

$N_0$  = contagem inicial do microrganismo alvo por grama

$N$  = contagem do microrganismo-alvo por grama após a realização de 1 ciclo log do processamento térmico.

$D_{70}$  = tempo (em minutos) para reduzir a contagem de microrganismos em 1 ciclo log à temperatura de referência.

Rearranjando a equação tem-se:

$$n^\circ \text{ de ciclos log após o processamento térmico} = P_{70}/D_{70}$$

As amostras do modelo cárneo foram coletadas, em triplicata, durante as etapas de inoculação do *pool* de esporos de *C. perfringens*, cozimento e resfriamento. Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do CTC/Ital e imediatamente analisadas, conforme indicado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Coleta das amostras durante as etapas de processamento do lote experimental e ensaios físico-químicos e microbiológicos realizados.

Etapas	Descrição da etapa	Amostras (n)	Ensaio
Inoculação	Antes da inoculação	3	<i>C. perfringens</i>
	Após a inoculação	3	<i>C. perfringens</i>
Cozimento	Antes do cozimento	3	Umidade, Proteína, Gordura, Cinzas, pH, Atividade de água, Nitrito e Nitrato
	Após o cozimento	3	<i>C. perfringens</i> , Nitrito e Nitrato
Resfriamento	-4°C*	3	<i>C. perfringens</i> , Nitrito e Nitrato
	5°C*	3	
	10°C*	3	

\* Após a estabilização da temperatura interna do produto em 10°C.

Para a realização dos ensaios físico-químicos foram usados os métodos analíticos preconizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2019b) e a quantificação de *C. perfringens* foi realizada segundo a norma ISO 7937 (ISO 7937, 2004).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Quantificação da solução de esporos

Os resultados da esporulação de *C. perfringens* estão descritos na Tabela 4.

Todas as culturas, incluindo o *pool* de culturas, apresentaram contagens de *C. perfringens* de 7 log esporos/g. Estes resultados comprovam a eficiência do método de esporulação descrito por Juneja et al. (1993) e também atendem aos requisitos para inoculação nas amostras de modelo cárneo.

**Tabela 3.** Contagem de *C. perfringens* nas soluções de esporos ao término da etapa de esporulação.

Microrganismos	<i>C. perfringens</i> (log esporos/g)
<i>C. perfringens</i> (NCTC 8798)	7,1
<i>C. perfringens</i> (ATCC 3626)	7,1
<i>C. perfringens</i> (ATCC 3628)	7,2
<i>C. perfringens</i> (ATCC 3629)	7,1
<i>C. perfringens</i> ( <i>pool</i> de culturas)	7,2

NCTC: National Collection of Type Cultures; ATCC: American Type Culture Collection.

#### 3.2. Caracterização inicial do modelo cárneo

Os resultados da caracterização inicial do modelo cárneo estão descritos nas Tabelas 4 e 5.

Os modelos cárneos apresentaram valores médios de umidade de 67,1%, proteína de 26,2% e gordura de 13,5%. As amostras de modelo cárneo dos tratamentos avaliados apresentaram diferença estatística entre si ( $p < 0,05$ ) somente em relação a determinação de cinzas, sendo que o tratamento NC apresentou valores de 1,65%, enquanto os demais tratamentos apresentaram valores de



aproximadamente 2,15%. Estes resultados estão dentro dos valores esperados considerando a formulação do modelo cárneo.

**Tabela 4.** Caracterização físico-química dos modelos cárneos

Tratamentos	Resultado (g/100g)*			
	Umidade	Proteína	Gordura	Cinzas
NC	67,11±0,12 <sup>a</sup>	26,26±0,23 <sup>a</sup>	13,47±0,08 <sup>a</sup>	1,65±0,12 <sup>b</sup>
CT	67,14±0,08 <sup>a</sup>	26,23±0,19 <sup>a</sup>	13,55±0,10 <sup>a</sup>	2,17±0,14 <sup>a</sup>
CN	67,12±0,15 <sup>a</sup>	26,28±0,22 <sup>a</sup>	13,44±0,11 <sup>a</sup>	2,15±0,11 <sup>a</sup>

NC: Não curado; CT: Cura Tradicional; CN: Cura Natural; \* Resultado médio de triplicata de amostras; letras minúsculas diferentes apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

Em relação a contagem de *C. perfringens*, as amostras de modelo cárneo apresentaram contagens inferiores ao limite de quantificação do método (1,0 log UFC/g) antes da inoculação com o *pool* de esporos. Por outro lado, as amostras de modelo cárneo avaliadas após a inoculação com o *pool* de esporos apresentaram contagens de *C. perfringens* de aproximadamente 3,2 log UFC/g. Este resultado indica que as matérias-primas usadas para elaboração do modelo cárneo não estavam contaminadas com esporos e/ou células vegetativas de *C. perfringens*, e que a inoculação ocorreu de forma uniforme para todos os tratamentos avaliados.

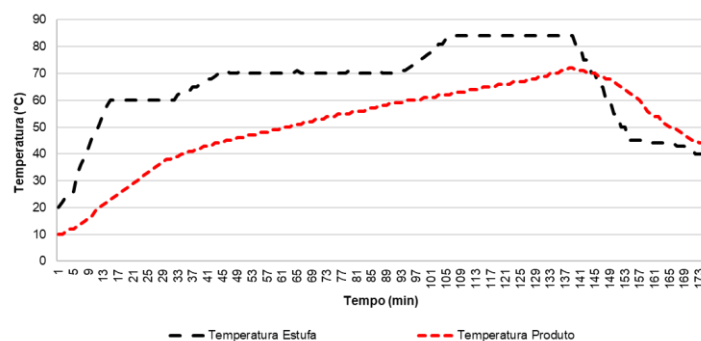
**Tabela 5.** Contagem de *C. perfringens* dos modelos cárneos antes e após a inoculação com a solução de esporos.

Tratamentos	<i>C. perfringens</i> (log UFC/g)	
	Antes da inoculação	Após a inoculação
NC	<1,0	3,2
CT	<1,0	3,2
CN	<1,0	3,3

NC: Não curado; CT: Cura Tradicional; CN: Cura Natural; UFC: Unidades formadoras de Colônias.

### 3.1. Cozimento e resfriamento

A Figura 1 mostra a evolução da temperatura interna do produto durante o processo de cozimento em estufa com vapor gradual, como é próprio do método escalonado.



**Figura 1.** Curva de cozimento do modelo cárneo pelo método escalonado de temperatura.

A temperatura máxima atingida internamente no produto foi de 73 °C. No processo de pasteurização, a intensidade estimada pela equação de Patashnik representada por  $P_{70}$  foi de 83,82 min, ou seja, foi equivalente a um processamento térmico de 83,82 min a 70 °C, que é a temperatura de referência. Salvo regulamentações técnicas específicas, valores entre 40 min e 60 min são usuais para produtos pasteurizados armazenados e comercializados sob refrigeração (FEINER, 2006).

Outra forma de avaliação é baseada na redução do número de ciclos log proporcionados pelas condições de pasteurização. Como o microrganismo-alvo adotado foi o *Streptococcus* do grupo D (*Enterococcus faecalis*), cujo  $D_{70} = 2,95$  min, aplicando-se a equação própria ( $P_{70}/D_{70}$ ) obtém-se como resultado a redução de 28,41 ciclos logarítmicos na contagem inicial.

A literatura recomenda um processamento térmico mínimo de 6D, ou seja, pelo menos uma redução de 6 ciclos logarítmicos (SILVA e GIBBS, 2009). Então, as condições de pasteurização empregadas no experimento foram mais rigorosas. Em princípio, o tempo de processamento térmico poderia ser reduzido para promover economia de energia e aumento de produtividade na escala industrial. Porém, é uma avaliação que deve ser feita caso a caso para não comprometer a vida útil do produto.

Convém mencionar que o *Streptococcus* do grupo D (*Enterococcus faecalis*) é uma bactéria deterioradora, cuja resistência térmica é superior à de diversas formas vegetativas de patógenos, tais como, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, dentre outras, as quais são destruídas com maior facilidade. Porém, esporos de *Bacillus* e *Clostridium* são pouco afetados pelo processo de pasteurização (FEINER, 2006).

A Figura 2 mostra a evolução da temperatura interna do produto durante o processo de resfriamento considerando as três condições avaliadas (-4 °C, 5 °C e 10 °C).

Nota-se que dentre as condições de resfriamento avaliadas, o tempo de estabilização final da temperatura interna do modelo cárneo foi de 11 min a -4°C, 28 min a 5 °C e de 140 min a 10 °C. A etapa de resfriamento é um processo muito importante para garantir a segurança dos alimentos. Seu objetivo é reduzir a temperatura dos alimentos de 60 °C para 10 °C em até 2 h. Este processo garante que o alimento não seja exposto por um tempo demasiadamente longo na zona de perigo. (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1997; AKUTSU et al., 2005). Sendo assim, o resfriamento a 10 °C ultrapassou em 20 min o tempo máximo recomendado de resfriamento na zona de perigo e não se mostrou efetivo.



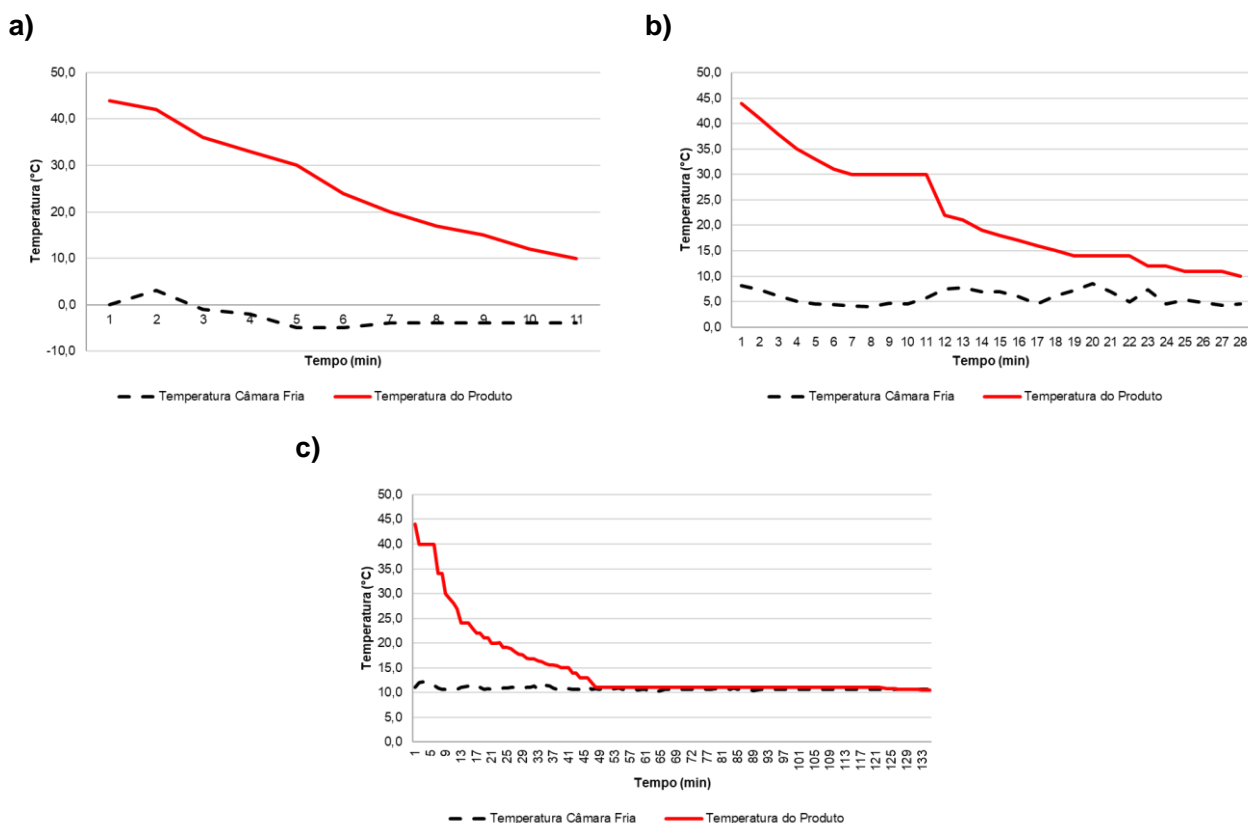


Figura 1. Curvas de resfriamento do modelo cárneo. a) -4 °C; b) 5 °C e c) 10 °C.

### 3.2. Determinação de nitrito e nitrato e contagem de *C. perfringens*

Os resultados de nitrito e nitrato nos modelos cárneos durante as etapas de cozimento e resfriamento encontram-se descritos na Tabela 6, enquanto os resultados de *C. perfringens* encontram-se descritos na Tabela 7.

As amostras de modelo cárneo do tratamento **Não Curado (NC)** apresentaram valores médios residuais de nitrito e nitrato de aproximadamente 0,0002 g / 100 g em todas as etapas de processo avaliadas. Este resultado está de acordo com o previsto considerando o limite mínimo de detecção dos métodos analíticos usados neste estudo e que neste tratamento não foram adicionados nitrito e/ou nitrato.

As amostras de modelo cárneo do tratamento **Cura Tradicional (CT)** apresentaram valores médios residuais de nitrato 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 (90% de cloreto de sódio e 10% de nitrito de sódio) 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 em torno de 0,0002 a 0,0005 g / 100 g são normalmente encontrados em produtos adicionados somente de nitrito (FEINER, 2016). Em relação ao nitrito, as amostras apresentaram valores médios de aproximadamente 0,0155 g / 100 g antes do cozimento, 0,0053 g / 100 g após o cozimento e se manteve estável nesta faixa

até o final da etapa de resfriamento. O processo de cura em produtos cárneos cozidos ocorre durante o cozimento e é possível verificar o consumo do nitrito durante esta etapa.

As amostras de modelo cárneo do tratamento **Cura Natural (CN)** apresentaram valores médios residuais de nitrato de aproximadamente de 0,0051 g / 100 g. Este fator pode estar relacionado com a ausência do crescimento de bactérias que possuem a capacidade de conversão do nitrato a nitrito, as chamadas bactérias nitrificantes. Os modelos cárneos passaram por uma etapa de cozimento (72 °C) e como estas bactérias possuem forma vegetativa, estima-se que estes microrganismos foram inativados durante esta etapa. Em relação ao nitrito, as amostras apresentaram valores médios de aproximadamente 0,0152 g / 100 g antes do cozimento e 0,0051 g / 100 g após o cozimento. Estes resultados permaneceram estáveis até o final do resfriamento.

**Tabela 6.** Resultados da determinação de nitrito e nitrato de sódio nas amostras de modelo cárneo.

Tratamento	Etapa	Atividade	g / 100 g*	
			Nitrito de sódio	Nitrato de sódio
Não Curado (NC)	Cozimento	Antes	0,0002±0,0000 <sup>c</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
		Após	0,0002±0,0000 <sup>c</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
	Resfriamento	Após (- 4 °C)	0,0002±0,0000 <sup>c</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
		Após (5 °C)	0,0002±0,0000 <sup>c</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
		Após (10 °C)	0,0002±0,0000 <sup>c</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
Cura Tradicional (CT)	Cozimento	Antes	0,0155±0,0001 <sup>a</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
		Após	0,0053±0,0001 <sup>b</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
	Resfriamento	Após (- 4 °C)	0,0052±0,0001 <sup>b</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
		Após (5 °C)	0,0054±0,0001 <sup>b</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
		Após (10 °C)	0,0053±0,0000 <sup>b</sup>	0,0002±0,0000 <sup>b</sup>
Cura Natural (CN)	Cozimento	Antes	0,0152±0,0001 <sup>a</sup>	0,0052±0,0003 <sup>a</sup>
		Após	0,0052±0,0001 <sup>b</sup>	0,0051±0,0000 <sup>a</sup>
	Resfriamento	Após (- 4 °C)	0,0051±0,0001 <sup>b</sup>	0,0050±0,0000 <sup>a</sup>
		Após (5 °C)	0,0052±0,0001 <sup>b</sup>	0,0052±0,0000 <sup>a</sup>
		Após (10 °C)	0,0053±0,0001 <sup>b</sup>	0,0051±0,0000 <sup>a</sup>

NC: Não curado; CT: Cura Tradicional; CN: Cura Natural; \* Resultado médio de triplicata de amostras; letras minúsculas diferentes apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) na coluna.

Em relação a contagem de *C. perfringens*, as amostras de modelo cárneo do tratamento **Não Curado (NC)** apresentaram contagens médias de 3,2 log UFC/g antes e após o tratamento térmico. Todas as temperaturas avaliadas durante o resfriamentos permitiram o crescimento de *C. perfringens*. Os modelos cárneos resfriados a - 4 °C e 5 °C apresentaram contagens médias entre 4,25 e 4,65 log UFC/g, enquanto o modelos cárneos resfriados a 10 °C apresentaram contagens médias de 5,54 log UFC/g.

As amostras de modelos cárneos dos tratamentos **Cura Tradicional (CT)** e **Cura Natural (CN)** apresentaram contagens médias de *C. perfringens* de 3,2 log UFC/g antes e após o tratamento térmico. Somente os modelos cárneos resfriados a 10 °C apresentaram crescimento de *C. perfringens* (4,4 log UFC/g). Desta forma, podemos inferir que dentro das condições avaliadas neste estudo a cura tradicional

e a cura natural possuem equivalência na inibição da germinação de esporos de *C. perfringens* durante o resfriamento nas seguintes condições: -4°C por 11 min e 5 °C por 8 min.

**Tabela 7.** Resultados da contagem de *C. perfringens* nas amostras de modelo cárneo.

Tratamento	Etapas	Atividade	<i>C. perfringens</i> (log UFC/g)*
Não Curado (NC)	Cozimento	Antes	3,21±0,01 <sup>c</sup>
		Após	3,20±0,00 <sup>c</sup>
	Resfriamento	Após (-4 °C)	4,25±0,00 <sup>b</sup>
		Após (5 °C)	4,65±0,00 <sup>b</sup>
		Após (10 °C)	5,54±0,01 <sup>a</sup>
Cura Tradicional (CT)	Cozimento	Antes	3,22±0,01 <sup>c</sup>
		Após	3,21±0,00 <sup>c</sup>
	Resfriamento	Após (-4 °C)	3,20±0,02 <sup>c</sup>
		Após (5 °C)	3,22±0,02 <sup>c</sup>
		Após (10 °C)	4,42±0,01 <sup>b</sup>
Cura Natural (CN)	Cozimento	Antes	3,21±0,02 <sup>c</sup>
		Após	3,21±0,00 <sup>c</sup>
	Resfriamento	Após (-4 °C)	3,21±0,00 <sup>c</sup>
		Após (5 °C)	3,20±0,00 <sup>c</sup>
		Após (10 °C)	4,41±0,04 <sup>b</sup>

NC: Não curado; CT: Cura Tradicional; CN: Cura Natural; UFC: Unidades Formadoras de Colônias; \* Resultado médio de triplicata de amostras; letras minúsculas diferentes apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05) na coluna.

#### 4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o nitrito, independentemente da fonte de origem, contribui na inibição da germinação de esporos de *C. perfringens* em produtos cárneos cozidos durante o etapa de resfriamento, desde que as condições de temperatura e tempo durante o resfriamento sejam controladas e não ultrapassem o tempo máximo recomendado de 2 h.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa concedida.

#### 6. REFERÊNCIAS

- AKUTSU, R.C; BOTELHO, R.A.; CAMARGO, E.B.; SÁVIO, K.E.O.; ARAÚJO, W.C. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, São Paulo, v.18, p.419-427, 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 272. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 18 mar. 2019, ed. 52, seção 1, pg.194, 2019a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal**. 2<sup>th</sup> ed.Brasil 2019. Brasília, DF: MAPA 2019b. p.158.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2014. Surveillance for foodborne disease outbreaks. United States, 2012, annual report. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex Alimentarius. Higiene dos Alimentos: Textos Básicos. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1997, v.3, p.64. Disponível em: <[https://acisat.pt/wp-content/uploads/2016/10/codex\\_alimentarius.pdf](https://acisat.pt/wp-content/uploads/2016/10/codex_alimentarius.pdf)>, Acessado em: 30/06/2022.
- CRAVEN, S. E. & L. C. BLANKENSHIP. 1985. Activation and injury of Clostridium perfringens spores by alcohols. **Applied and Environmental Microbiology**. v.50, p.249–256.
- FEINER, G. **Meat products handbook: Practical science and technology**. Woodhead Publishing, Cambridge. 2006. p.671.



- GONÇALVES, J.R., GERMER, S.P.M. **Princípios de Esterilização de Alimentos**. Manual Técnico n.10. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, São Paulo. 1992; 116p.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1996. **Microorganisms in foods**. 5. Characteristics of microbial pathogens. Blackie Academic, London.
- JUNEJA, V.K., CALL, J.E., MILLER, A.J. Evaluation of methylxanthines and related compounds to enhance *Clostridium perfringens* sporulation using a modified Duncan and Strong medium. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, 1993, v.2, p.203-218.
- JUNEJA, V. K., HUANG, L., THIPPAREDDI, H. H. Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* in cooked cured pork. **International Journal of Food Microbiology**. 2006, v.110, p.85–92.
- JUNEJA, V. K., NOVAK, J. S., LABBE, R. J. 2010. *Clostridium perfringens*, p. 53–70. In JUNEJA, V. K., NOVAK, J. S., LABBE, R. J. Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions, 1st ed. **ASM Press**, Washington, DC.
- KING, A. M., GLASS, K. A., MILKOWSKI, A. L., SINDELAR, J. J. 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**. 2015a, v.78, p.1527–1535.
- KING, A. M., GLASS, K. A., MILKOWSKI, A. L., SINDELAR, J. J. Impact of clean-label antimicrobials and nitrite derived from natural sources on the outgrowth of *Clostridium perfringens* during cooling of deli-style turkey breast. **Journal of Food Protection**. 2015b, v.78, p.946–953.
- MOHR, T. B., JUNEJA, V. K., THIPPAREDDI, H. H., SCHAFFNER, D. W., BRONSTEIN, P. A., SILVERMAN, M., COOK, L. V. Assessing the performance of *Clostridium perfringens* cooling models for cooked, uncured meat and poultry products. **Journal of Food Protection**. 2015, v.78, p.1512–1526.
- REDONDO-SOLANO, M., VALENZUELA-MARTINEZ, C., CASSADA, D. A., SNOW, D. D., JUNEJA, V. K., BURSON, D. E., THIPPAREDDI, H. H. Effect of meat ingredients (sodium nitrite and erythorbate) and processing (vacuum storage and packaging atmosphere) on germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in ham during abusive cooling. **Journal of Food Microbiology**. 2013, v.35, p.108–115.
- 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**, 5<sup>th</sup> ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2015.p.995.
- SAUTER, E. A., KEMP, J. D., LANGLOIS, B. E. Effect of nitrite and erythorbate on recovery of *Clostridium perfringens* spores in cured pork. **Journal of Food Science**. 2006, v.42, p.1678–1679.
- SCALLAN, E., GRIFFIN, P. M., AUGULO, F. J., TAUXE, R. V., HOEKSTRA, R. M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States— unspecified agentes. **Emerging Infectious Diseases**. v.17, p.16–22.
- SCHRODER, D. J., & BUSTA, F. F. Growth of *Clostridium perfringens* in meat loaf with and without added soybean protein. **Journal of Milk and Food Technology**. 1971, v.34, p.215–217.
- SILVA, F.V.M.; GIBBS, P.A. **Principles of thermal processing: pasteurization**. In: SIMPSON, R. (ed.) Engineering Aspects of Thermal Food Processing. CRC Press, USA, 2009. Chapter 2, p.13-48.
- U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 1999. **Performance standards for the production of certain meat and poultry products**, appendix B. Compliance guidelines for cooling heat-treated meat and poultry products (stabilization). U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Washington, DC. Disponível em: <[https://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/95-033F/95-033F\\_Appendix%20B.html](https://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/95-033F/95-033F_Appendix%20B.html)>, Acessado em: 10/02/2022.
- U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2012. *Clostridium perfringens*. In: **Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins**, 2<sup>nd</sup> ed. U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD.

## Revisão ortográfica

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