



CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE ESPOROS DE BACTÉRIAS ANAERÓBICAS PSICROTRÓFICAS ISOLADOS DE MASSAS CÁRNEAS CRUAS COMERCIAIS DESTINADAS A ELABORAÇÃO DE MORTADELAS

Guilherme dos Santos **Paiva**¹; Míriam Gonçalves **Marquezini**²; Valéria Christina Amstalden **Junqueira**²; Thiago Santos **Almeida**²; Renata **Bromberg**³

Nº 17214

RESUMO – A qualidade microbiológica das mortadelas estáveis em temperatura ambiente está relacionada aos fatores intrínsecos e extrínsecos que somados aos parâmetros de processamento podem contribuir para o desenvolvimento do *Clostridium botulinum*. Este trabalho avaliou as características bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e de germinação dos esporos de bactérias anaeróbicas psicrotróficas isolados de massas cárneas cruas comerciais de mortadelas. Foram selecionados três isolados, de um total de 32 culturas produtoras de lipase, correspondentes ao perfil da cultura de *C. botulinum*, e suas resistências foram testadas frente a parâmetros de processamento usados comercialmente em mortadelas estáveis em temperatura ambiente. Observou-se perfil crescimento semelhante ao apresentado pelo *C. sporogenes*, germinação entre 22 e 25 horas de incubação e faixa de temperatura ótima para crescimento de 25 a 35°C. Quanto ao efeito inibitório de agentes químicos, físicos e biológicos na germinação dos esporos constatou-se inibição da germinação em atividade de água de 0,930 e 0,940, pH de 3,0 a 4,6, lactato de sódio a 2,5 e 3,0%, nitrito de sódio a 50ppm, ou nitrito de sódio em concentração superior a 200ppm quando acrescentado de eritorbato de sódio. Os esporos dos microrganismos isolados apresentaram-se resistentes ao tratamento térmico a 74°C por 15s. Já as células vegetativas apresentaram-se sensíveis com redução de 6 ciclos log ao final do processo. Também foi evidenciado que culturas de bactérias lácticas inibiram a germinação dos esporos. Os esporos de clostrídios apresentaram sensibilidade à nisina com atividade de até $1,6 \times 10^5$ UI

Palavras-chaves: esporos, *Clostridium botulinum*, massas cárneas cruas comerciais, mortadela.

1 Graduação em Engenharia de Alimentos, UNIMEP, Santa Bárbara d'Oeste-SP; guilherme_paiva_@hotmail.com;

2 Colaborador, Funcionários do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP;

3 Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas-SP; renatabromberg@gmail.com.



ABSTRACT – *The microbiological quality of the shelf stable mortadella is related to their intrinsic and extrinsic factors that added to the processing parameters may contribute to the development of Clostridium botulinum. This work evaluated the biochemical, physiological, morphological and germination characteristics of psychrotrophic anaerobic bacteria spores isolated from commercial raw mortadella flesh. Three isolates were selected from a total of 32 lipase producing cultures, corresponding to the C. botulinum culture profile, and their resistance were tested against commercially used processing parameters of shelf stable mortadella. Growth pattern similar to that presented by C. sporogenes was observed, germination happened between 22 and 25 hours of incubation and optimum temperature for growth was between 25 to 35°C. Regarding the inhibitory effect of chemical, physical and biological agents on spore germination, inhibition of water activity of 0.930 and 0.940, pH of 3.0 to 4.6, sodium lactate at 2.5 and 3.0%, sodium nitrite at 50 ppm alone, or higher than 200 ppm when sodium erythorbate was added. Tested spores were resistant to heat treatment at 74°C for 15s. However, the vegetative cells were sensitive with reduction of 6 log cycles at the end of the heat process. It has also been shown that cultures of lactic acid bacteria inhibited spore outgrowth. Clostridium spores showed sensitivity to nisin at $1,6 \times 10^5$ UI.*

Keywords: spores, *Clostridium botulinum*, raw bated meat commercial.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o 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. Do total de casos, a região sudeste representa 44,6%. A mortadela, a carne esterilizada, a salsicha e a torta de frango são os alimentos mais relacionados em casos de botulismo alimentar. O *C. botulinum* é uma bactéria que em condições favoráveis pode produzir no alimento uma neurotoxina que ocasiona o botulismo (CERESER et al., 2008).

A mortadela é um produto cárneo industrializado por meio da emulsão de carnes de animais de açougue, adicionado de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido ao tratamento térmico. As técnicas de processamento, e a qualidade da matéria-prima processada classificam o produto em: “Mortadela”, “Bologna”, “Tipo Bologna”, “Italiana” e “Mortadela de Carne de Ave” (BRASIL, 2000). Durante o processamento da mortadela aplicam-se temperaturas inferiores a 100°C que são capazes de inativar as células vegetativas dos microrganismos presentes, fazendo com que a vida útil do produto seja estendida sem alterações sensoriais e nutritivas. Porém, esse tratamento térmico não apresenta a mesma eficiência de inativação caso o produto esteja contaminado por esporos bacterianos, inclusive de *C. botulinum*.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

Os fatores intrínsecos destes produtos, como alta atividade de água, pH favorável e presença de ingredientes proteicos, fazem com que a proliferação de microrganismos patogênicos seja ainda mais favorecida dependendo do tipo de armazenamento empregado. Este aspecto vem sendo discutido por toda a indústria de carnes e por órgãos fiscalizadores, os quais buscam métodos de conservação seguros do produto, tendo em vista que alguns destes produtos cárneos são mantidos em temperatura ambiente. O Brasil é um país com diferentes condições climáticas, sendo que em geral os fatores extrínsecos (temperatura e umidade) não favorecem a manutenção da qualidade dos alimentos. Salienta-se que deverão ser seguidas as recomendações de processamento e armazenamento do Ofício-Circular nº 005/2015/CGI/DIPOA/DAS (BRASIL, 2015) que determina que o prazo de validade para as mortadelas comercializadas no país sob temperatura ambiente não deva exceder 60 dias.

A partir dos conhecimentos dos fatores intrínsecos e extrínsecos da mortadela, pode-se controlar o crescimento de patógenos, como o *C. botulinum*, utilizando-se dentre as várias barreiras, ingredientes como, por exemplo, o cloreto de sódio e o nitrito de sódio (AMSTALDEN et al., 1997).

Tendo em vista, a complexidade do processo de produção de mortadelas e o perigo do *C. botulinum* para a segurança microbiológica destas, este trabalho teve como objetivo avaliar as características bioquímicas, fisiológicas, morfológicas e de germinação de esporos de bactérias psicrótróficas anaeróbias isolados de massas cárneas cruas comerciais de mortadelas.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Culturas e condições de cultivo

As culturas de *Clostridium* spp. usadas no experimento foram obtidas da coleção do Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC), pertencente ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), isoladas previamente de amostras de massas cárneas cruas comerciais de mortadelas. Essas culturas foram mantidas em ultrafreezer a -82°C em criotubos contendo caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) suplementado com 30% de glicerol.

As culturas foram descongeladas em geladeira convencional. A ativação foi realizada a partir da inoculação de 1mL em 10mL de caldo BHI suplementado com 0,1% de tioglicolato de sódio (BHI+T), incubado a 30°C por 24h e estocado até o uso em geladeira regulada a 8±1°C. Devido ao alto risco na manipulação de culturas padrões de *C. botulinum*, foi usado como controle positivo o *C. sporogenes* PA 3679, além do *C. perfringens* NCTC 8798 e *Staphylococcus aureus* ATCC 14200 como controles negativos das reações.



2.2. Caracterização dos microrganismos isolados e produção de esporos

A caracterização das culturas foi realizada por meio de testes bioquímicos, fisiológicos e morfológicos, conforme SILVA et al. (2010) e STEVENS et al. (2015). Foram realizados os testes de coloração de Gram, produção de catalase, redução do nitrato, motilidade, fermentação da lactose, hidrólise da gelatina, produção de lipase, produção de lecitinase e crescimento aeróbio.

Para a produção dos esporos dos microrganismos isolados e do *C. sporogenes* foi empregada a metodologia descrita por MAH et al. (2009).

Para padronização das soluções de esporos foi usada a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (2010). A partir das suspensões de esporos dos microrganismos CP5, OP2, JP2 e do *C. sporogenes* foi transferido 1mL de cada suspensão para um tubo de ensaio e ajustada a concentração com água deionizada no espectrofotômetro na densidade óptica de 630nm até a faixa entre 0,8 e 1,0 de absorvância ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

2.3. Determinação da curva de germinação e crescimento dos esporos

Para determinação da curva de crescimento foi empregada a metodologia descrita por DONG et al. (2007) adaptando a incubação em microplaca de poliestireno com 96 poços em U.

Foram transferidos 100µL da solução de esporos das culturas CP5, JP2, OP2 e do controle positivo *C. sporogenes* para cada poço de uma microplaca de poliestireno estéril nas colunas de 1 a 9 e nas fileiras A e B; C e D; E e F; G e H, respectivamente. Em seguida, foram transferidos 100µL de caldo BHI+T nos mesmos poços. Nas colunas 11 e 12 foram inoculados 200µL do caldo BHI+T, como controle do meio de cultura. A microplaca foi incubada a 30°C por 48h em anaerobiose. Foram realizadas leituras em leitora de microplacas (Microplate Reader, AlpaX) em períodos pré-determinados e os resultados foram expressos em absorvância. Os dados obtidos foram tratados pelo modelo de Gompertz modificado usando o programa DMFit (BARANY & ROBERTS, 1995) para avaliar o período de lag durante o crescimento dos microrganismos.

2.4. Triagem de atividade antimicrobiana

Para realização dos testes de triagem verificou-se a capacidade de germinação dos esporos em diferentes temperaturas de estocagem, a avaliação do efeito inibitório dos agentes químicos e físicos na germinação dos esporos, a avaliação da eficácia do tratamento térmico com e sem adição de nitrito de sódio, a influência de microrganismos competidores na germinação dos esporos e a avaliação da sensibilidade dos esporos em presença de nisina.



2.4.2. Verificação da capacidade de germinação e crescimento dos esporos em diferentes temperaturas de estocagem

Foram transferidos 100µL da solução de esporos das culturas CP5, JP2, OP2 e do controle positivo (*C. sporogenes*) para cada poço de microplacas estéreis, individualizadas para cada cultura, seguindo metodologia descrita no item 2.3 e estas foram incubadas nas seguintes condições: 25°C e 35°C por 48h e 4°C e 10°C por 30d em anaerobiose.

2.4.3. Avaliação do efeito inibitório de agentes químicos, físicos e biológicos na germinação dos esporos

Para a avaliação do efeito inibitório de agentes químicos e físicos na germinação dos esporos foi empregada a metodologia descrita por ALNOMAN et al. (2015). Foram avaliados diferentes valores que representam fatores intrínsecos que controlam a estabilidade microbiológica e físico-química das mortadelas, como de atividade de água (0,930; 0,940; 0,950; 0,955; 0,960 e 0,970), pH (3,0; 4,0; 4,6; 5,0; 6,0; 7,0 e 9,0), nitrito de sódio (10; 25; 50; 100; 150; 200; 250 e 300ppm), eritorbato de sódio (500; 1000; 1500; 2000 e 2500 ppm) e lactato de sódio (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0%).

Foram transferidos 100µL da solução de esporos das culturas CP5, JP2, OP2 e *C. sporogenes* para tubos contendo 6mL de caldo BHI+T suplementado com o agente químico ou físico na concentração desejada. Os tubos foram homogeneizados em vortex por 60s, uma alíquota de 1mL foi usada para leitura da absorbância em leitora de microplacas na OD_{630nm} (leitura inicial). Os tubos foram incubados a 30°C por 48h em anaerobiose. Foi retirada uma nova alíquota de 1mL dos tubos, realizada leitura na OD_{630nm} e os resultados foram expressos em absorbância.

2.4.3.1. Avaliação da eficácia do tratamento térmico com e sem adição de nitrito de sódio

A partir da suspensão de esporos foi inoculado 1mL em tubos contendo 6mL de caldo BHI+T e estes foram homogeneizados em vortex por 60s. Uma alíquota de 1mL foi inoculada em profundidade em ágar TSC. Após a solidificação do ágar as placas foram incubadas a 35°C por 48h em anaerobiose. Os tubos foram transferidos para banho-maria e estes foram submetidos a tratamento térmico a 74°C por 15s, seguido do resfriamento em banho de gelo, para posterior retirada de uma alíquota de 1mL seguido de plaqueamento em profundidade em ágar TSC. Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias e os resultados foram expressos em log de UFC/mL.

Para a avaliação da eficácia do tratamento térmico combinado com o nitrito de sódio, os tubos de caldo BHI foram suplementados com 150ppm de nitrito de sódio e após o tratamento térmico foram incubados a 30°C por 48h em anaerobiose.



2.4.3.2. Influência de culturas competidoras na germinação e crescimento das culturas isoladas de clostrídios

Foram inoculados 100µL da solução de esporos padronizada de cada cultura e 100µL das culturas de bactérias lácticas CTC 204, CTC 369, CTC 386, CTC 483 e CTC 484 em tubos contendo 6mL de caldo BHI e estes foram homogeneizados em vortex por 60s. Ágares TSC e MRS foram inoculados em profundidade com alíquotas de 1mL, após a solidificação do meio as placas foram incubadas a 30°C por 48h em anaerobiose. Os tubos de caldo BHI contendo as culturas foram incubados a 30°C por 48h em anaerobiose e, ao final da incubação foi realizado um novo plaqueamento em ágar TSC e ágar MRS, conforme descrito anteriormente. Após o período de incubação foi realizada a contagem das colônias e os resultados foram expressos em log de UFC/mL.

2.4.3.3. Avaliação da sensibilidade dos esporos em presença de nisina

A solução de nisina foi preparada de acordo com as especificações do fornecedor. Para tanto, 1g de nisina (Nisaplan) foi adicionado de 10mL de Tris-HCL pH 8,0. A solução foi filtrada usando filtros de seringa com poro de 0,22µm.

Uma alíquota de 1mL das soluções dos esporos foi transferida para placas de Petri estéreis, adicionado ágar TSC seguindo-se de homogeneização. Após a solidificação do meio de cultura orifícios circulares de aproximadamente 5mm de diâmetro foram perfurados neste. Foram realizadas diluições seriadas 1:2 da solução de nisina até a concentração de 1:128 e 100µL de cada concentração foram inoculados em cada orifício. As placas permaneceram dispostas em cabine de fluxo laminar por 20min para secagem dos compostos e estas foram incubadas a 30°C por 48h em anaerobiose. Após o período de incubação foi observada a presença de halos transparentes ao redor dos orifícios e verificada a concentração inibitória. Como controle positivo foi usada uma cultura de *S. aureus* ATCC 12600.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Isolamento e purificação dos microrganismos

Um total de 32 culturas produtoras de lipase, correspondentes ao perfil da cultura de *C. sporogenes*, foram submetidas à esporulação e reavaliadas quanto às suas características fisiológicas, biológicas e morfológicas. Deste total, 10 culturas pertenciam ao grupo das anaeróbias mesófilas e 22 culturas ao grupo das anaeróbias psicrotróficas. Após esporulação e reavaliação quanto às suas características fisiológicas, biológicas e morfológicas, 3 culturas apresentaram resultados que se assemelham ao perfil do *C. sporogenes*, considerando a produção de lipase, todas elas bactérias anaeróbias psicrotróficas: CP5, JP2 e OP2. Com base nas características dos isolados estes podem ser considerados como pertencentes ao gênero *Clostridium*.



3.2. Determinação da curva de germinação e crescimento dos esporos

Os resultados da determinação da curva de germinação e crescimento das culturas CP5, JP2 e OP2 dos esporos e do *C. sporogenes* são apresentados na Figura 1.

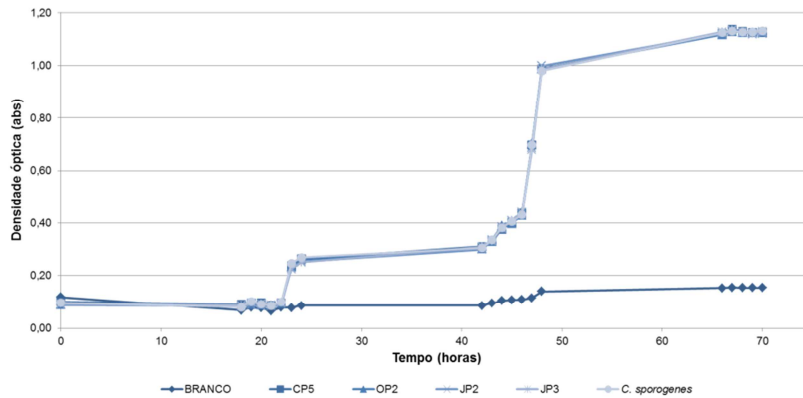


Figura 1. Resultados da curva de crescimento dos esporos dos microrganismos isolados após incubação na temperatura de 30°C.

É possível observar que as culturas isoladas na temperatura de 30°C apresentaram o mesmo perfil de crescimento do *C. sporogenes*. Observou-se também que a germinação ocorreu entre 22 e 25 horas de incubação. Após o período de germinação, foi constatado o modelo de Gompert modificado (BARANY & ROBERTS, 1995) que o início da fase lag foi com $45,645 \pm 0,24$ horas de incubação.

3.3. Verificação da capacidade de germinação e crescimento dos esporos em diferentes temperaturas de estocagem

Os resultados da verificação da capacidade de germinação e crescimento dos esporos dos microrganismos isolados em diferentes temperaturas foram apresentados na Figura 2.

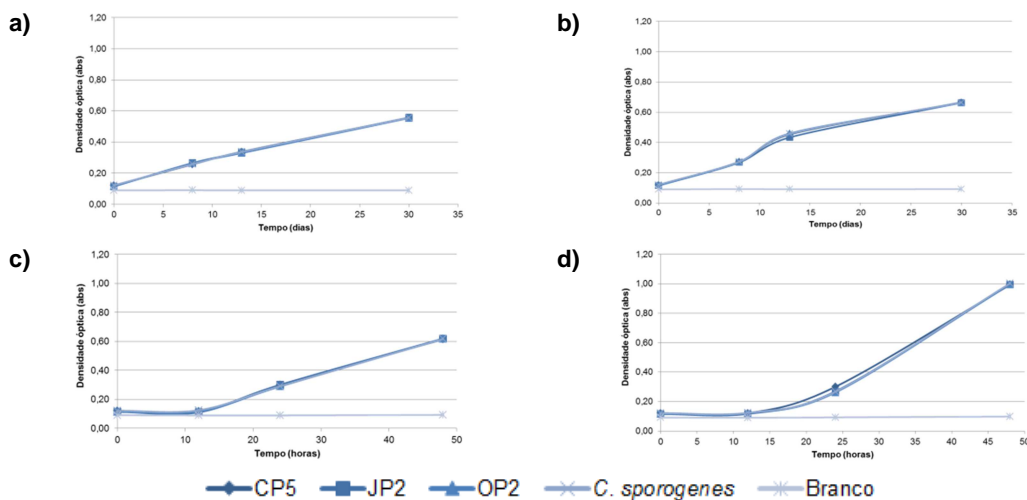


Figura 2. Capacidade de germinação e de crescimento dos esporos em diferentes temperaturas de estocagem: a) 4°C/30d; b) 10°C/30d; c) 25°C/48h e d) 35°C/48h.



Observou-se que a temperatura é realmente um fator fundamental para o retardo da germinação dos esporos e crescimento das vegetativas. Comparando a germinação das culturas, observou-se que em um período de 20 dias o valor de absorbância atingido foi próximo a 0,400 a 4°C e a 10°C apresentou valor próximo a 0,600. Nas temperaturas de 25 e 35°C observou-se crescimento rápido, sendo a transição da fase lag a log no período entre 12 e 23 horas e entre 12 e 24 horas, respectivamente. Portanto, presume-se que a temperatura ótima para crescimento ocorra entre 25 e 35°C. DODDS & AUSTIN (2001) mostraram que a temperatura mínima de crescimento para as cepas de *C. botulinum* B, E e F é em torno de 3,3°C, sendo que a temperatura ótima de crescimento é entre 18 e 25°C e a máxima é de 45°C.

3.4. Avaliação do efeito inibitório de agentes químicos, físicos e biológicos na germinação dos esporos

É possível observar na Figura 3a a inibição de aproximadamente 90,9% da germinação das culturas em valores de atividade de água de 0,930 e 0,940 e aproximadamente redução de 68,2% na atividade de água de 0,950 e 0,955, nos demais valores não houve inibição. Em 2002, GELLI et al. apresentaram um estudo no qual a atividade de água inferior a 0,93 era fator limitante para o crescimento do *C. botulinum*, dizendo ainda que a bactéria não possui habilidade competidora frente a outros microrganismos. CERESER et al. (2008) também relata que o pH inferior a 4,5 cessa sua multiplicação. Estas informações se assemelham com os resultados apresentados na Figura 3b, onde houve inibição de aproximadamente 90,9% da multiplicação das culturas testadas em pH com valores de 3,0 a 4,6. O pH 5 apresentou inibição de aproximadamente 24,54%.

Observou-se na Figura 3c que houve inibição de aproximadamente 90,9% da germinação das culturas a partir da concentração de 50ppm de nitrito de sódio. AMSTALDEN et al. (1997) observaram a formação de toxina botulínica em presunto e mortadela inoculados com aproximadamente 10^4 esporos de *C. botulinum* tipos A e B, considerando uma temperatura de estocagem de 30°C. Nas amostras de mortadela preparadas com 200mg/kg de nitrito de sódio e 500mg/kg de eritorbato de sódio, após 28 dias de armazenamento a 30°C não foi detectada toxina botulínica e o nitrito sofreu redução para 1,6mg/kg. Já o presunto armazenado na mesma temperatura apresentou toxina botulínica após 12 dias com residual de nitrito equivalente a zero. Reforçando o efeito inibitório do nitrito, PIVNICK et al. (1969) concluíram que para suprir a ausência de nitrito em carne suína há a necessidade da adição de concentrações superiores a 6,1% de cloreto de sódio para evitar a produção de toxina botulínica, quando adicionados 10^6 esporos de *C. botulinum* por grama de carne, seu estudo foi com carne de porco curada.

Observou-se na Figura 3d que houve efeito inibitório do lactato de sódio de aproximadamente 71,82% nas concentrações de 2,5 e 3,0% devido à alteração em relação à densidade óptica. Segundo MILLER et al. (1993) uma concentração de 2% de lactato de sódio é capaz de impedir a produção de toxina, como também inibir o crescimento do *C. botulinum* em carne de peru. MEYER et al. (2003) relataram que adicionando 2,5% de lactato de sódio em peito de peru cozido armazenado em temperatura ambiente, foi possível um retardo de 14d para que ocorresse a germinação de esporos de *C. sporogenes*.

A Figura 3e apresenta a ineficiência de inibição do eritorbato de sódio, no qual em nenhuma das concentrações avaliadas tiveram eficiência inibitória. Porém, avaliando a Figura 2f observou-se fator inibidor moderado, média de 38%, do nitrito com eritorbato a partir de 50ppm a 150ppm. Em contra partida, nas concentrações superiores a 200ppm a inibição foi mais eficiente, aproximadamente 90,9%. JAY et al. (2005) e relataram o efeito competidor do eritorbato o qual reduz o nitrito quando adicionados em carnes curadas formando o óxido nitroso que combinará com a mioglobina para realizar outras reações químicas.

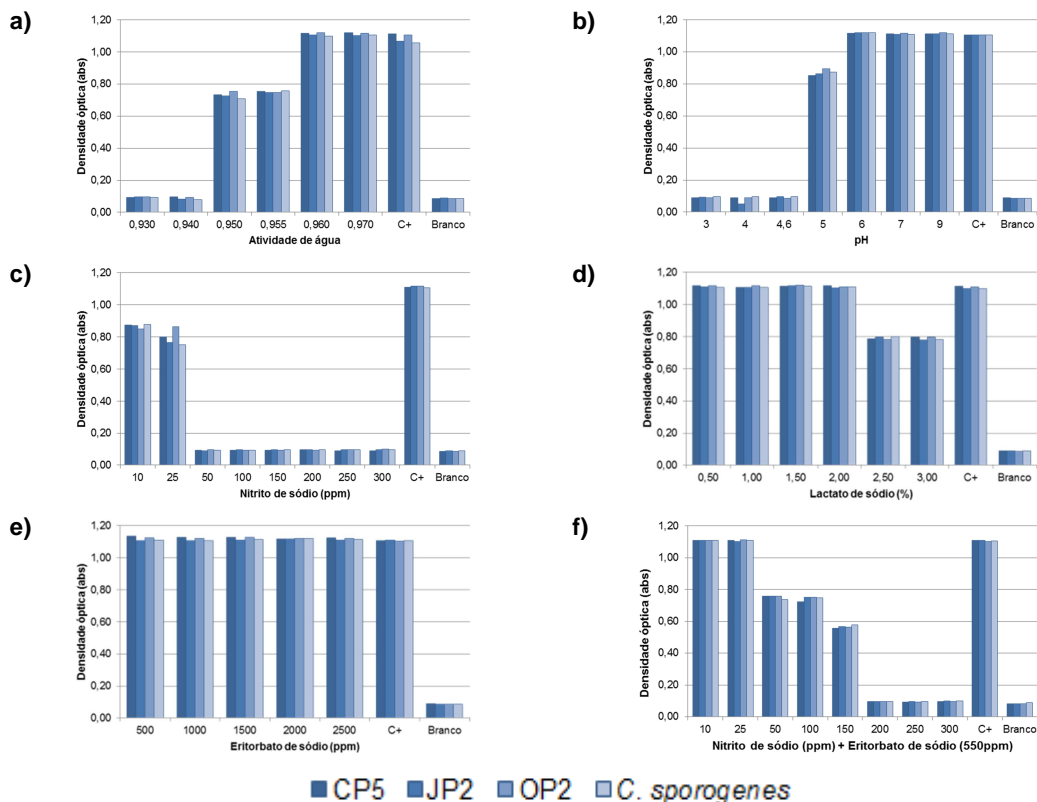


Figura 3. Efeito de inibição dos agentes químicos e físicos frente aos esporos dos microrganismos isolados e do *C. sporogenes*. a) atividade de água; b) pH; c) nitrito de sódio; d) lactato de sódio; e) eritorbato de sódio e f) nitrito de sódio (150ppm) combinado com eritorbato de sódio.



3.5. Avaliação da eficácia do tratamento térmico em presença de nitrito de sódio

Os esporos dos microrganismos isolados e do *C. sporogenes* apresentaram resistência ao tratamento térmico de 74°C/15s sendo que as contagens iniciais e finais permaneceram em aproximadamente 6,0 log UFC/g. Em contra partida, as células vegetativas dos microrganismos isolados e do *C. sporogenes* apresentaram sensibilidade ao tratamento térmico com a redução de 6 ciclos log ao final do processo.

Na Figura 4, observou-se a ocorrência de crescimento do microrganismo após o período de incubação. Este resultado indica a sensibilidade do nitrito de sódio durante sua exposição a altas temperaturas.

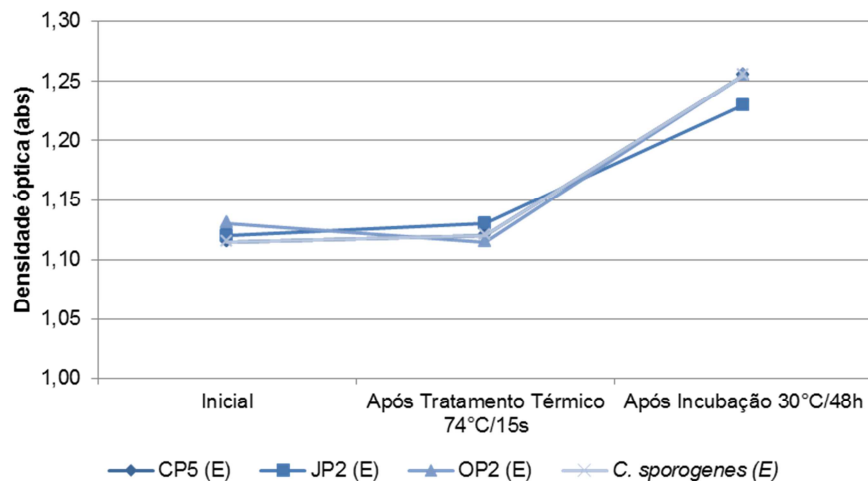


Figura 4. Avaliação da resistência das culturas testes submetidas a tratamento térmico de 74°C por 15s combinado com a adição de 150ppm de nitrito de sódio *in vitro*.

3.6. Influência de culturas competidoras na germinação dos esporos.

As culturas de bactérias lácticas CTC 204 e CTC 484 inibiram entre 0,5 e 1,0 log UFC/mL o crescimento dos esporos das culturas selecionadas se comparado com os resultados do controle positivo (Figura 5). No estudo realizado por BROMBERG et al. (2006) foram testadas as cepas das bactérias lácticas CTC 204, CTC 369, CTC 386, CTC 483 e CTC 484 e foi verificada a capacidade de produção de bacteriocinas por estas bactérias. As bacteriocinas apresentaram potencial de inibição frente à *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

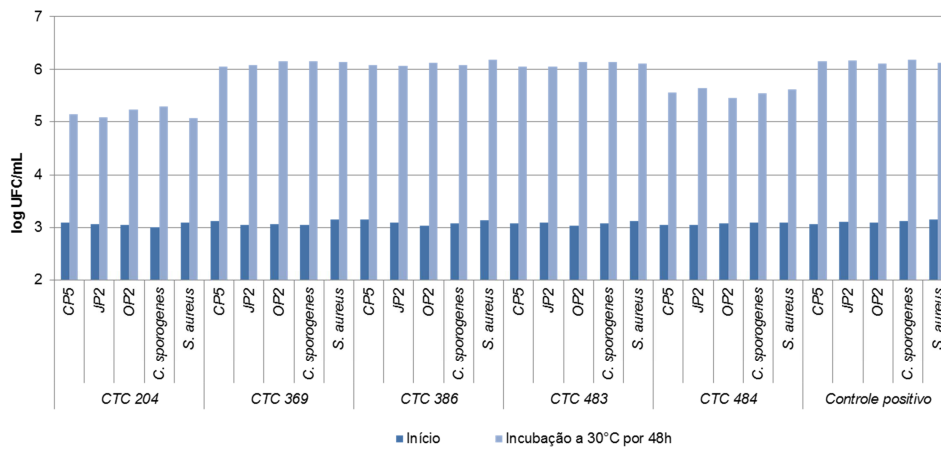


Figura 5. Influência de culturas competidoras na germinação e crescimento das culturas isoladas de clostrídios.

3.7. Avaliação da sensibilidade dos esporos em presença de nisina

A nisina é uma bacteriocina produzida por bactérias lácticas, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e tem como função retardar ou inibir o crescimento de outras bactérias (MELO et al., 2005). É um tipo de conservante natural que pode ser usado em processos que se utilizam tratamentos térmicos moderados.

Os esporos dos microrganismos isolados e o *C. sporogenes* apresentaram sensibilidade à nisina com atividade de até $1,6 \times 10^5$ UI. O controle *S. aureus* apresentou sensibilidade até a concentração $6,4 \times 10^5$ UI. Os dados permitem concluir que a aplicação da nisina *in vitro* inibiu a germinação dos esporos de clostrídios. MAZZOTTA et al. (1997), utilizando caldo BHI, relataram que para inibição de contagens entre 3 a 7 log UFC/g do *C. botulinum* é necessária uma concentração de nisina superior a 10^2 UI, em comparação com outras espécies sensíveis à nisina.

4. CONCLUSÃO

As culturas de esporos possuem perfis bioquímicos, fisiológicos e morfológicos semelhantes ao *C. botulinum*. As curvas de crescimento, germinação e faixa de temperatura ótima para crescimento apresentaram-se semelhantes ao de *C. sporogenes*. As culturas apresentaram-se resistentes aos principais fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como pH, aw, tratamento térmico, conservantes químicos e biológicos que compõem a estabilidade microbiológica de mortadelas estáveis em temperatura ambiente.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida.

6. REFERÊNCIAS

ALCANTARA, M.; MORAIS, I.C.L.; MATOS, C.; SOUZA, O.D.C.C. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.6, n.1, p.1-20, 2012.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

- ALNOMAN, M.; UDOMPIJITKUL, P.; SABJA, D.P.; SARKER, M.R. The inhibitory effects of sorbate and benzoate against *Clostridium perfringens* type A isolates. **Food Microbiology**, v.48, p.89-98, 2015.
- AMSTALDEN, V.C.J.; SERRANO, A.M.; MANHANI, M.R. Avaliação da toxigênese de *C. botulinum* em mortadela e presunto. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.154-159, 1997.
- BARANY, J.; ROBERTS, T.A. Mathematics of predictive food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, n.2, p.199-218, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 04, de 05 de abril de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Mortadela. In: Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 08 de dezembro de 2016.
- 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 junho de 2017.
- BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.135-144, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 18 de junho de 2017.
- CERESER, N.; COSTA, F.M.R.; JÚNIOR, O.D.R.; SILVA, D.A.R.; SPEROTTO, V.R. Botulismo de origem alimentar. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.280-287, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000100049&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 6 de junho de 2017.
- DODDS, K.L.; AUSTIN, J.W. **Clostridium botulinum**. In: DOYLE, P.M.; BEUCHAT, R.L.; MONTVILLE, J.T. *Microbiologia de los Alimentos*, p.301-318, 2001.
- DONG, Q., TU, K., GUO, L., LI, H., ZHAO, Y. Response surface model for prediction of growth parameters from spores of *Clostridium sporogenes* under different experimental conditions. **Food Microbiology**, v.24, p.624-632, 2007.
- FREITAS, M.A.; BORGES, W.; HO, L.L. A. Statistical Model for Shelf Life Estimation Using Sensory Evaluation Scores. Relatório Técnico RTP- 10/2001, 2001.
- GELLI, D.S.; JAKABI, M.; SOUZA, A. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.44, n.6, p.321-324, 2002.
- GUERRA, I.C.D. Efeito do teor de gordura na elaboração de mortadela utilizando carne de caprinos e de ovinos de descarte. Dissertação (Mestrado em Química e Bioquímica de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, 88f, 2010.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. 2011. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>>. Acesso em 08 de dezembro de 2016.
- JAY, M.J.; LOESSNER, J.M.; GOLDEN, A.D. **Protección de los alimentos con sustancias químicas y mediante biocontrol**. In: *Microbiologia moderna de los alimentos*, p.311-315, 2005.
- 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.
- MAZZOTTA, A.S.; CRANDALL, A.D.; MONTVILLE, T.J.; Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. **Applied and Environmental Microbiology**, p.2654-2659, v.63, n.7, 1997.
- MELO, N.R.; SOARES, N.F.F.; GONÇALVES, M.P.J.C. Nisina: Um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v.52, n.304, p.921-938, 2005.
- MEYER, J.D.; CERVENY, J.G.; LUCHANSKY, J.B. Inhibition of nonproteolytic, psychrotrophic clostridia and anaerobic sporeformers by sodium diacetate and sodium lactate in cook-in-bag turkey breast. **Journal Food Protection**, v.66, n.8, p.1474-1478, 2003.
- MILLER, A.J.; CALL, J.E.; WHITING, R.C. Comparison of organic acid salts for *Clostridium botulinum* control in an uncured turkey product. **Journal Food Protect**, v.56, p.958-962, 1993.
- OLIVEIRA, M.J.; ARAUJO, W.M.C.; BORGIO, L. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.736-742, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 08 de dezembro de 2016.
- OLIVEIRA, T.D.; MARQUEZINI, M.G.; LEMOS, A.L.S.C.; JUNQUEIRA, V.C.A.; BROMBERG, R. Presença de esporos de bactérias anaeróbias mesófilas e psicrotóricas em massas cárneas cruas comerciais destinadas a elaboração de produtos cárneos cozidos e curados. CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2016.
- PIVNICK, H.; BARNETT, H.W.; NORDIN, H.R.; RUBIN, L.J. Factors affecting the safety of canned, cured, shelf-stable luncheon meat inoculated with *Clostridium botulinum*. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.2, p.141-148, 1969.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4 ed. Varela, 624p. 2010.
- STEVENS, D.L.; BRYANT, A.E.; CARROLL, K. *Clostridium*. In: JORGENSEN, J.H. and PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**, 11th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2015.p.940-966