



AMANDA REJANE ALVES DE ÁVILA

**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE LINGUIÇA SUÍNA
FRESCAL**

LAVRAS – MG

2011

AMANDA REJANE ALVES DE ÁVILA

**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DE LINGUIÇA SUÍNA FRESCAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientadoras

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Dra. Simone Cristina Marques

LAVRAS – MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Ávila, Amanda Rejane Alves de.

Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de linguiça
suína frescal / Amanda Rejane Alves de Ávila. – Lavras : UFLA,
2011.

114 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Bactérias patogênicas. 2. Resistência antimicrobiana. 3.
Ácidos orgânicos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

AMANDA REJANE ALVES DE ÁVILA

**SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS
DE LINGUIÇA SUÍNA FRESCAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de junho de 2011.

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Dra. Ivana Aparecida da Silveira	UNILAVRAS
Dra. Roberta Hilsdorf Piccolli	UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan
Orientadora

LAVRAS – MG
2011

Aos meus pais, Maria Elisa e Benedito.

Às minhas irmãs, Deborah e Sheila.

À querida Simone.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de realizar um sonho e por me conceder força em todos os momentos.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Ciência dos Alimentos e ao Departamento de Biologia, por permitirem a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo financiamento do projeto.

À professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela orientação, oportunidade e ensinamentos.

À pós-doutoranda Simone Cristina Marques, pela coorientação, apoio, ensinamentos, confiança e amizade.

À professora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, pela coorientação e pelos ensinamentos.

À pós-doutoranda Carla Luíza de Ávila, pelo grande apoio na análise estatística.

Aos professores doutores Eduardo Mendes Ramos e Alcinéia de Lemos Souza Ramos, do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela grande ajuda na elaboração dos embutidos.

À professora Antônia dos Reis Figueira e suas orientadas, do Departamento de Fitopatologia, pela ajuda nas leituras das microplacas para titulação.

À Cíntia Ramos, pela ajuda na identificação molecular.

À Maiara Carvalho, pela ajuda nos cálculos de química.

Ao Whesley Rangel, do Departamento de Ciências dos Solos, pela valiosa ajuda na análise estatística.

À Clarisse Maximo Arpini, pela ajuda nas coletas de sangue.

Ao Gerson Marques, do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela ajuda na mensuração da atividade de água das amostras.

Aos colegas de laboratório, em especial Francesca, Sarita, Lilian Cruz, Marianna Rabelo, Ana Elisa, Angélica, Carolina Collela e Gilberto, pela ajuda durante a realização do experimento.

Aos colegas do Laboratório de Cogumelos, em especial Emerson, Maiara e Willian, pelo carinho e momentos de descontração.

A todos os funcionários envolvidos no nosso dia a dia de trabalho: Cidinha, Eliane, Lucilene, Dona Ironдина, Du, especialmente Ivani, Paulinho e Sandra.

Agradeço, de forma especial, aos meus queridos pais, Maria Elisa e Benedito, pelo amor incondicional; e às minhas amadas irmãs Deborah e Sheila, por sempre me apoiarem e por estarem sempre presentes na minha vida.

Às amigas de república: Edna, Juliana e Natália, não esquecendo das meninas do Matisse: Thálita, Fernanda, Lígia, Flávia, Priscila e Maysa, pela convivência e momentos de descontração.

Às amigas mais que especiais, Aline, Angélica, Fernanda Gandra e Kedma, pelos momentos mais que divertidos, por todo carinho e amizade.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Linguiças frescal apresentam-se como potenciais veículos de microrganismos patogênicos, podendo ser associadas a enfermidades transmitidas por alimentos. A resistência conferida a agentes antimicrobianos por bactérias patogênicas torna-se um fator preocupante. Estirpes que apresentam perfil de multirresistência a antibióticos representam grave problema para a saúde pública, acarretando menor disponibilidade de medicamentos para o tratamento de doenças em humanos. Assim, alternativas, tais como a adição de ácidos orgânicos na elaboração de embutidos frescal, devem ser implementadas para evitar que o alimento veicule patógenos resistentes. Este trabalho teve como principais objetivos: a avaliação da qualidade microbiológica das linguiças; a identificação de isolados bacterianos por meio do sequenciamento da região 16S do rDNA; a seleção de bactérias com perfil de multirresistência a antimicrobianos; a seleção do ácido orgânico com maior eficácia na inibição de bactérias multirresistentes; e a elaboração de linguiças suína frescal inoculadas com cepas multirresistentes de bactérias distintas para a avaliação da inibição dos patógenos pelo ácido láctico. Vinte amostras de linguiças suína frescal industrial, de marcas distintas, foram adquiridas em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais, no período de junho a agosto de 2010. Análises para a avaliação da qualidade microbiológica do produto foram realizadas. Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos, foi utilizado o método disco-difusão em ágar. Estirpes com perfil de multirresistência foram submetidas, isoladamente, aos testes de determinação da concentração mínima inibitória e determinação da concentração mínima bactericida, utilizando-se os ácidos láctico e acético, ambos em oito concentrações. Linguiças suína frescal foram elaboradas com bactérias patogênicas distintas e acrescidas de ácido láctico nas concentrações de 1,5 e 4,0 M, sendo armazenadas a 4°C por um período de 15 dias. Os resultados indicaram a contaminação das amostras por *Salmonella* Typhi, *S. Typhimurium* e *S. Paratyphi*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus xylosus* e *S. epidermidis*. Vinte e um isolados apresentaram índice MAR igual ou superior a 0,5 e foram considerados multirresistentes aos antimicrobianos testados. No teste de determinação da concentração mínima bactericida, *in vitro*, o ácido láctico mostrou-se mais eficaz na inibição dos patógenos que o ácido acético. Na matriz alimentar com adição das linhagens de bactérias, o tratamento com ácido láctico, nas duas concentrações, reduziu ligeiramente a população dos patógenos ao longo do tempo de estocagem.

Palavras-chave: Bactérias patogênicas. Resistência antimicrobiana. Ácidos orgânicos.

ABSTRACT

Fresh sausages can be potential vehicles for pathogenic microorganisms, what may associate them with food diseases. The resistance attributed to antimicrobial agents by pathogenic bacteria becomes a worrying factor. Strains which have antibiotic multiresistance profile represent a serious problem to public health, resulting in lower availability of medication in order to treat diseases in human beings. Thus, alternatives such as the addition of organic acids in the elaboration of fresh meat products should be implemented to avoid that the food carries resistant pathogens. This work had as its principal objectives the evaluation of the microbiological quality of the sausages; the identification of bacterial isolates through the sequencing of the region 16S of rDNA; the selection of bacteria with antimicrobial multiresistance profile; the selection of organic acid with better efficiency in the multiresistance bacterial inhibition; and the elaboration of fresh pork sausages inoculated with different multiresistant bacteria strains aiming to evaluate the inhibition of pathogens by lactic acid. Twenty industrial fresh pork sausage samples, from diverse trademarks, were purchase from various places located in Minas Gerais State, from June and August 2010. Analyses to the evaluation of the microbiological quality of the product were performed. To the antimicrobial sensitivity test, the disk diffusion agar method was used. Strains with multiresistance profile were submitted, singly, to minimum inhibitory concentration test and to minimum bactericidal concentration test, by using lactic and acetic acids, both in eight concentrations. Fresh pork sausages were made with different pathogenic bacteria, lactic acid was added in 1.5 and 4.0 M concentrations, stored under 4°C within 15 days. The results showed the contamination of the samples by *Salmonella* Typhi, *S. Typhimurium* and *S. Paratyphi*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus xylosum* and *S. epidermidis*. Twenty-one isolates present MAR index equal or superior to 0.5 and were considered multiresistant to the tested antimicrobials. In the minimum bactericidal concentration test, *in vitro*, the lactic acid was proved more efficient in the pathogen inhibition than the acetic acid. Concerning the food matrix with addition of the bacterial lineages, the lactic acid treatment, in both concentrations, slightly reduced the population of pathogens during the storage period.

Keywords: Pathogenic bacteria. Antimicrobial resistance. Organic acids.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	O embutido linguiça	13
2.2	Risco microbiológico em carnes e derivados	14
2.3	Contaminação microbiana de embutidos	15
2.3.1	<i>Salmonella</i> spp.....	17
2.3.2	<i>Escherichia coli</i>	18
2.3.3	<i>Clostridium perfringens</i>	20
2.3.4	<i>Streptococcus</i> spp.....	21
2.3.5	<i>Staphylococcus</i> sp.....	22
2.3.6	<i>Listeria monocytogenes</i>	24
2.3.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
2.3.8	<i>Bacillus cereus</i>	27
2.3.9	<i>Campylobacter</i> spp.....	28
2.4	Antimicrobianos	30
2.5	Conservantes em alimentos	31
2.5.1	Nitrato e nitrito.....	32
2.5.2	Ácidos orgânicos.....	33
	REFERÊNCIAS	36
	CAPÍTULO 2 Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de linguiça suína frescal	49
1	INTRODUÇÃO	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1	Obtenção das amostras	53
2.2	Análises microbiológicas	53
2.2.1	Preparo das amostras	53
2.2.2	Contagem total de aeróbios mesófilos	54
2.2.3	Contagem total de enterobactérias	54
2.2.4	Enumeração de <i>Clostridium</i> sulfito-redutor	54
2.2.5	Contagem total de <i>Streptococcus</i> spp.	55
2.2.6	Contagem total de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	55
2.2.7	Contagem total de <i>Bacillus cereus</i>	55
2.2.8	Isolamento e identificação de <i>Staphylococcus</i> sp.	56
2.2.9	Determinação de coliformes totais e termotolerantes e isolamento e identificação de <i>Escherichia coli</i>	56
2.2.10	Pesquisa e identificação de <i>Salmonella</i> spp.	57
2.2.11	Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	58
2.2.12	Isolamento de <i>Campylobacter</i> spp.	59

2.3	Caracterização genotípica	60
2.4	Avaliação do potencial hidrogeniônico (ph) e da atividade de água (a _w) das amostras	61
2.5	Teste de sensibilidade a antimicrobianos	61
2.6	Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)	62
2.7	Determinação da concentração mínima bactericida	63
2.8	Inibição de bactérias por ácido lático em linguiça suína frescal	63
2.9	Análise estatística	65
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1	Avaliação da qualidade microbiológica de linguiças suína frescal ..	67
3.2	Teste de sensibilidade a antimicrobianos	77
3.3	Determinação da concentração mínima inibitória	81
3.4	Determinação da concentração mínima bactericida	82
3.5	Inibição de bactérias por ácido lático em linguiça suína frescal	84
4	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE	105

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Produtos de origem animal são alimentos amplamente consumidos, sendo dado destaque especial à carne e aos seus derivados, uma vez que fazem parte do hábito alimentar de uma parcela considerável da população.

Dentre os derivados da carne, as linguiças se destacam como um dos produtos cárneos com elevada aceitação pelos consumidores, devido, principalmente, ao menor valor de mercado em relação aos cortes nobres de carnes. Em adição, praticidade e rapidez no preparo e boa qualidade nutricional têm sido pré-requisitos no momento da compra dos alimentos.

As linguiças frescal apresentam-se como potenciais veículos de microrganismos patogênicos, seja em razão da elevada atividade de água, da exposição a agentes contaminantes em função da intensa manipulação durante o preparo, além da contaminação cruzada ou armazenamento em temperaturas inadequadas. Aliadas a esse fato, enfermidades transmitidas por alimentos são relatadas em função do consumo de alimentos contaminados, acarretando grande incidência de doenças e representando sério problema para a saúde pública.

Nesse sentido, torna-se de fundamental importância a aplicação de medidas de controle, englobando todas as etapas nas quais o alimento é envolvido, desde a obtenção da matéria-prima até a comercialização do produto final. Medidas preventivas, como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle e a adoção de Boas Práticas de Fabricação pelas indústrias, tornam-se imprescindíveis, contribuindo de maneira significativa para a garantia da qualidade higiênico-sanitária do produto.

Outro fator preocupante em relação às bactérias patogênicas é a resistência a agentes antimicrobianos conferida a elas. Estirpes que apresentam

perfil de multirresistência a antibióticos constituem-se em grave problema para a saúde coletiva, o que acarreta menor disponibilidade de medicamentos para o tratamento de doenças em humanos.

Assim, alternativas devem ser implementadas para evitar que o alimento veicule patógenos resistentes, assegurando ao consumidor maior confiabilidade.

A adição de ácidos orgânicos, como láctico e acético, na elaboração de linguiças vem sendo utilizada como conservante em alimentos, conferindo ação inibitória sobre a microbiota presente. Legislações específicas consentem a adição desses compostos em embutidos frescal, tornando uma alternativa aceitável para a inibição de patógenos.

Visando à importância em se investigar a presença de bactérias patogênicas em processados cárneos, o presente trabalho propôs-se a: avaliar a qualidade microbiológica de linguiças suína frescal, comercializadas no sul do Estado de Minas Gerais, e comparar com a legislação vigente; identificar os isolados bacterianos por meio do sequenciamento da região 16S do rDNA; selecionar estirpes com perfil de multirresistência a antimicrobianos; selecionar, em testes *in vitro*, o ácido orgânico com maior eficácia na inibição de bactérias multirresistentes; e elaborar linguiças suína frescal inoculadas com cepas multirresistentes de bactérias distintas para testar a eficácia do ácido selecionado em inibir os patógenos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O embutido linguiça

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), embutido é todo produto elaborado com carnes ou órgãos comestíveis, podendo ou não ser curado e cozido, condimentado, defumado e dessecado, contido em envoltório natural ou artificial (BRASIL, 1997).

Dentre os embutidos, a linguiça, segundo a Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é um produto cárneo industrializado, obtido de carnes de diferentes espécies animais, adicionado ou não de tecidos adiposos, embutido em envoltórios naturais ou artificiais e submetido aos mais diversos e adequados processos tecnológicos. No preparo da linguiça têm-se, como ingredientes obrigatórios, carnes de diferentes espécies de animais – tipo suína, bovina, de frango –, e sal, e, como ingredientes opcionais, água, gordura, proteínas vegetais ou animais, açúcares, aditivos intencionais, aromas, especiarias e condimentos (BRASIL, 2000).

Linguiças classificadas como frescal, obtidas a partir de carnes cruas, não são maturadas nem dessecadas, sendo comercializadas em gomos acondicionados em embalagens plásticas. Os invólucros plásticos e a conservação desses produtos sob refrigeração prolongam sua vida útil, cujo prazo para o consumo oscila entre 1 a 6 dias (PARDI et al., 2001). No que diz respeito à denominação de venda, o produto é designado linguiça, seguido da expressão que o caracterize, de acordo com sua apresentação ao consumidor, como, por exemplo, linguiça de carne suína, linguiça de pernil suíno, linguiça mista, dentre outras (BRASIL, 2000).

2.2 Risco microbiológico em carnes e derivados

A carne e seus derivados constituem-se nos alimentos que mais preocupam os serviços de saúde pública, em razão dos riscos que oferecem pela veiculação de bactérias patogênicas (LISERRE et al., 2002; SAMELIS et al., 2005).

Em função da sua composição química, que apresenta grande quantidade de água disponível, a carne é considerada um substrato ideal para o desenvolvimento bacteriano. Dessa forma, os cuidados higiênico-sanitários durante o abate, o processamento e a comercialização são fundamentais para sua segurança microbiológica (LABADIE, 1999).

A qualidade da carne e de seus produtos é influenciada diretamente por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre eles, destacam-se o pH próximo à neutralidade, a alta atividade de água e a temperatura de armazenamento (BATISTA; SILVA; SOARES, 1999). Além desses fatores, fontes prováveis de contaminação compreendem os envoltórios, temperos ou condimentos, misturas de diferentes tipos de ingredientes, bem como a água utilizada no processo de obtenção do embutido (LISERRE et al., 2002; MANHOSO, 1996; MARTINIS; FRANCO, 1998; SAMELIS et al., 2005).

As áreas de criação de animais apresentam-se como foco inicial para a contaminação da carne. No momento do abate, as principais fontes de contaminação por microrganismos estão relacionadas à sangria, à pele do animal e ao trato gastrointestinal. O uso de equipamentos não estéreis durante a sangria, como facas, por exemplo, contaminam o sangue do animal, podendo os microrganismos ficarem depositados ao longo da carcaça. Em relação à pele, microrganismos presentes nesse órgão podem contaminar a carne pela utilização de equipamentos não higienizados corretamente no momento do abate ou pelo contato direto da pele com a carne. Outra fonte provável de contaminação é o

trato gastrointestinal do animal, que pode sofrer perfurações e, assim, contaminar a superfície da carcaça. Dessa maneira, um programa adequado de segurança deve ser implementado, englobando condições de saúde e bem-estar durante o abate do animal, além da redução de disseminação da contaminação durante o processamento, armazenamento e distribuição da carne (DESMARCHELIER et al., 2007; JAY, 2005; MATARAGAS et al., 2007).

Nesse contexto, medidas dirigidas ao controle de riscos em carnes e produtos cárneos, como Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle devem ser adotadas a fim de se ter um plano de controle efetivo durante a elaboração e comercialização desses produtos (CHOKESAJJAWATEE et al., 2009).

2.3 Contaminação microbiana de embutidos

Dentre os microrganismos frequentemente presentes em embutidos, destacam-se diferentes tipos de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (BARBUTI; PAROLARI, 2002). Em razão da presença desses agentes patogênicos, produtos cárneos podem constituir risco à saúde pública, uma vez que essas bactérias são causas comuns de toxinfecções alimentares (PARDI et al., 2001).

Em trabalho realizado por Marques et al. (2006), a qualidade higiênico-sanitária de 40 amostras de linguiça frescal, comercializadas nos municípios de Lavras e Três Corações/MG, foi avaliada. As análises microbiológicas detectaram contaminação por coliformes termotolerantes e *Staphylococcus coagulase* positiva em 35% das amostras, sendo os embutidos considerados impróprios para o consumo.

Em outro estudo, realizado por Spricigo et al. (2008), 125 amostras de linguiça suína tipo frescal, de 12 marcas distintas disponíveis no comércio de

Lages/SC, foram coletadas aleatoriamente e analisadas. O resultado foi positivo para *Salmonella* spp., sendo que 12,8% das amostras estavam contaminadas pelo patógeno.

Pelisser et al. (2009) analisaram 72 amostras de alimentos, incluindo queijo, salaminho e linguiça colonial, todas coletadas na região do Alto Uruguai Catarinense/SC. A partir das 18 amostras de linguiça colonial, 84 cepas de *Staphylococcus* spp. foram isoladas, das quais 20% foram identificadas como *Staphylococcus coagulase negativa*.

Já em pesquisa realizada por Chokesajjawatee et al. (2009), foi avaliada a presença de *S. aureus* em 155 amostras de um produto tailandês fermentado à base de carne suína. A incidência de *S. aureus* foi de 39,35%, sendo os fatores de risco para a contaminação correlacionados com o fabricante e pH do produto.

Little et al. (2008) estudaram a prevalência de *Campylobacter* e *Salmonella* em 3959 amostras de carnes do Reino Unido, no período de 2003-2005. O resultado confirmou a presença dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter* em 2,4% e 7,2% das amostras, respectivamente. Dentre os diferentes tipos de carne analisadas, a contaminação em carne suína por *Campylobacter* foi de 6,3%, seguida de 3,9% das amostras contaminadas por *Salmonella*.

Em trabalho conduzido por Ferreira et al. (2007), 38 lotes provenientes de 17 produtores de linguiça tradicional portuguesa foram avaliados. Foi constatada a ausência de *Campylobacter* spp. e *E. coli* O157 nas amostras, e *Clostridium perfringens*, quando presentes, não estavam em níveis de preocupação em relação à saúde pública. *Salmonella* spp. foi detectada em dois lotes da linguiça, e mais de 60% dos lotes analisados estavam contaminados por *L. monocytogenes*.

2.3.1 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella*, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são descritas como bastonetes Gram-negativos, não esporogênicas, oxidase negativas, catalase positivas e aeróbias facultativas, sendo a maioria das cepas móveis devido a flagelos peritríquios (HOLT et al., 1994). Apresentam faixa de crescimento em temperaturas de 5 a 45°C, com temperatura ótima de 37°C; multiplicam-se na faixa de pH entre 4,0 e 9,0, sendo seu pH ótimo situado entre 6,5 e 7,5, e desenvolvem-se em alimentos que apresentam atividade de água acima de 0,93 (JAY, 2005).

Há apenas duas espécies de *Salmonella* (*Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*), que são divididas em oito grupos (BOYD et al., 1996). O gênero *Salmonella* contém cerca de 2324 linhagens diferentes, as quais são denominadas sorovares ou sorotipos. São diferenciáveis por seus antígenos O, H e Vi, pelo esquema de Kaufmann-White, sendo os sorotipos divididos em sorogrupos de acordo com os fatores antigênicos comuns (FORSYTHE, 2002).

De acordo com Bersot et al. (2001), a *Salmonella* é um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos, uma vez que está amplamente distribuída na natureza e possui um grande número de reservatórios.

Em função de sua capacidade de disseminação no meio ambiente, essa bactéria pode ser isolada de diferentes locais (águas doces superficiais, costa marítima, carnes de animais, pescados, verduras, ovos) e, conseqüentemente, de diversas matérias-primas alimentares (JAKABI et al., 1999).

Bactérias do gênero *Salmonella* são responsáveis por graves surtos de toxinfecções alimentares, sendo os produtos de origem animal os principais veículos de transmissão desse patógeno. Dentre esses produtos, a carne e seus derivados são considerados alimentos bastante susceptíveis à contaminação, sendo reportados como veículos frequentes desse microrganismo (CAPITA et

al., 2003; ESCARTIN et al., 1999; FSIS, 1998; GIOMBELLI, 2000; PARDI et al., 2001).

Apesar de inúmeras políticas de controle, *Salmonella* spp. continua sendo um dos principais agentes etiológicos das enfermidades transmitidas por alimentos (FOODNET, 2005).

A maioria dos sorotipos de *S. enterica* causa gastroenterite autolimitada caracterizada por diarreia, cólicas, vômito e febre. O sorotipo de maior significância em saúde pública é o da *Salmonella* Enteritidis (POPPE, 1994), relacionado com infecção alimentar por ovos e seus derivados. Em muitos casos, a *S. Enteritidis* determina uma doença autolimitante, mas, particularmente em crianças e idosos, pode ser grave o suficiente para requerer internação hospitalar (JAY, 2005). A variação entre as estirpes pode afetar a resposta imune quanto à infectividade e à invasão (FORSYTHE, 2002). Dois outros sorotipos, *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi, são responsáveis por febres sistêmicas, que podem ser fatais se não forem tratadas. Febres tifoide e paratifoide são associadas à falta de saneamento e são, principalmente, doenças características de países em desenvolvimento (RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009).

Embora a maioria dos surtos cause doenças de gravidade leve a moderada, doenças graves resultando em morte ocorrem, principalmente, em populações idosas e imunodeprimidas (PATHANIA et al., 2010).

2.3.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal de humanos e de uma variedade de animais. A espécie é descrita como bastonete Gram-negativo, catalase positiva, oxidase negativa, móvel em função de seus

flagelos peritríquios, com raras exceções, e capaz de fermentar glicose com produção de ácido e gás (HOLT et al., 1994).

As cepas típicas de *E. coli* são mesófilas, capazes de crescer entre 7 e 46°C, com temperatura ótima de 37°C; desenvolvem-se em alimentos com atividade de água mínima de 0,95 e multiplicam-se numa faixa de pH entre 5,5 e 7,5, com o mínimo entre 4,0-4,5 (JAY, 2005).

Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas, epidemiologia e sorotipagem, as linhagens de *E. coli* consideradas patogênicas são agrupadas em seis classes: EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), EHEC (*E. coli* enterohemorrágica), EaggEC ou EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* difusivamente aderente) (BUCHANAN; DOYLE, 1997).

Os surtos decorrentes da infecção por *E. coli* (EPEC, EIEC, EaggEC e EHEC) são considerados severos, sendo as linhagens de *E. coli* enterohemorrágica e *E. coli* enteroagregativa classificadas como microrganismos emergentes (MARTINS et al., 2003).

A principal via de transmissão de *E. coli* se dá por meio do consumo de alimentos contaminados por fezes, seja direta ou indiretamente, destacando-se alimentos como o leite cru e as saladas cruas. A carne e seus derivados também são considerados importantes veículos desse microrganismo, assim como todos os alimentos excessivamente manipulados (MAGNANI et al., 2000; PARDI et al., 2001). Outra importante fonte de infecção conhecida é a transmissão pessoa a pessoa, presumivelmente, por meio da via oral-fecal, em razão de hábitos de higiene inadequados (BRASIL, 2002).

2.3.3 *Clostridium perfringens*

A espécie *C. perfringens* é descrita como bastonete Gram-positivo, aerotolerante, imóvel e esporogênica, esporulando facilmente no intestino, mas raramente em meios de cultura. Cerca de três quartos das cepas formam cápsulas, predominantemente compostas por polissacarídeos (HOLT et al., 1994).

De maneira geral, as cepas de *C. perfringens* são mesófilas, multiplicando-se em temperaturas entre 37 e 45°C, com faixa ótima situada entre 35-40°C, e desenvolvem-se em atividade de água mínima de 0,93. Em relação ao pH, crescem e esporulam bem em pH situado entre 6,0 e 7,0, mas, geralmente, não crescem abaixo de 5,0 e acima de 8,5 (JAY, 2005).

Clostridium perfringens é considerado um importante agente patogênico causador de intoxicações alimentares, enterites em humanos e enterotoxemia em animais domésticos. Essa bactéria produz em torno de 15 toxinas, as quais se dividem em cinco tipos toxigênicos (A, B, C, D e E), que se diferenciam com base na produção de toxinas (STAGNITTA; MICALIZZI; GUZMÁN, 2002; VARNAN; EVANS, 1996).

Após a ingestão de um alimento com quantidades iguais ou superiores a 10^6 células vegetativas/g, as bactérias se multiplicam no intestino e esporulam, liberando a enterotoxina. Os sintomas aparecem de 8 a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado e consistem, principalmente, em espasmos abdominais e diarreia (MOSEL; GARCIA, 1993).

Essa bactéria é comumente encontrada em produtos de origem animal, como carnes bovinas e de aves, e em alimentos desidratados como sopas e vegetais, sendo o nível de contaminação refletido diretamente pelas condições higiênico-sanitárias de obtenção e processamento dos alimentos (LABBE, 2001; OLIVEIRA; FRANCO; CARVALHO, 1994; VARNAN; EVANS, 1996).

Em relação aos produtos de origem animal, alimentos à base de carne bovina e de frango têm sido relatados como os principais causadores de intoxicação alimentar por *C. perfringes*. Em virtude da alta prevalência da bactéria no trato intestinal dos animais, dificilmente consegue-se evitar a contaminação da carne fresca, devendo-se, então, ser considerada a possibilidade da sua ocorrência (PARDI et al., 2001).

2.3.4 *Streptococcus* spp.

As bactérias do gênero *Streptococcus*, pertencentes à família *Streptococcaceae*, são descritas como cocos Gram-positivos, com formato esférico ou ovoide, não esporogênicas, aeróbias facultativas, catalase e oxidase negativas, imóveis, além de serem responsáveis pela produção de exotoxinas (alfa-hemolítica, beta-hemolítica ou não hemolítica), que contribuem para sua patogenicidade (HOLT et al., 1994).

De maneira geral, os estreptococos crescem em temperatura ótima de 37°C, com as temperaturas máximas e mínimas variando entre as espécies (JAY, 2005).

O gênero é definido por uma combinação de características antigênica, hemolítica e fisiológica nos grupos A, B, C, D, F e G. Os agentes etiológicos comumente envolvidos em doenças humanas são do Grupo A, compreendendo apenas uma espécie, *Streptococcus pyogenes*, com 40 tipos antigênicos, e do Grupo D, englobando 5 espécies: *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus durans*, *Streptococcus avium* e *Streptococcus bovis*. Dentre as enfermidades mais comuns, causadas pelo Grupo A, destacam-se a faringite estreptocócica, uma das infecções mais frequentes em crianças na idade escolar, e a escarlatina, uma faringite acompanhada de erupções cutâneas típicas, além de outras infecções supurativas e septicêmicas. Já os estreptococos do Grupo D

produzem uma síndrome clínica similar à toxinfecção causada por *Staphylococcus*, com diarreia, cólica abdominal, náusea, vômito, febre, calafrio e vertigem (BENENSON, 1995; FDA/CFSAN, 2003).

O período de incubação varia de 2 a 36 horas após a ingestão de alimentos contaminados por estreptococos do Grupo D, e de 1 a 3 dias por estreptococos do Grupo A. Alimentos como leite não pasteurizado, sorvetes, ovos, lagosta, presunto, saladas de batata, pudins e pratos preparados com antecedência e deixados à temperatura ambiente por muitas horas podem ser responsáveis pela transmissão da bactéria (FDA/CFSAN, 2003).

2.3.5 *Staphylococcus* sp.

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, pertencentes à família *Staphylococcaceae*, são descritas como cocos Gram-positivos, imóveis, não formadoras de esporos, medindo de 0,8-1,0 µm. Quando visualizadas ao microscópio, aparecem em forma de cacho de uva, por se dividirem em planos diferentes. Entretanto, de acordo com a idade da colônia, podem ser encontradas isoladas, aos pares, agrupadas em tétrades ou, ainda, em pequenas cadeias. O metabolismo dessas espécies é bastante diversificado: podem realizar respiração aeróbica, anaeróbica e fermentação de carboidratos. São catalase positivas (exceção para *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* e *Staphylococcus saccharolyticus*) e oxidase negativas (exceto *Staphylococcus caseolyticus*, *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus sciuri*) (GARRITY; HOLT, 2001; HOLT et al., 1994).

Os estafilococos crescem em temperaturas entre 10 e 46°C, com faixa ótima de 30-37°C. O pH ótimo situa-se próximo da neutralidade (entre 6,0 e 7,0), mas o crescimento pode ocorrer entre valores de 4,0 e 9,8. Com relação à atividade de água, considera-se 0,86 como o valor mínimo (JAY, 2005).

O gênero *Staphylococcus* é subdividido em 40 espécies, que se dividem de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a maioria coagulase negativa, com exceção de *S. aureus*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus delphini* (BANNERMAN, 2003; KWOK; CHOW, 2003).

Bactérias desse gênero são responsáveis pela produção de enterotoxinas estafilocócicas. *S. aureus* pode produzir uma grande variedade de enterotoxinas (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R e U), mas 95% dos surtos de toxinfecção são causados por enterotoxinas clássicas: A, B, C, D e E, sendo a enterotoxina A a mais produzida (BALABAN; RASOOLY, 2000; HWANG et al., 2007; LETERTRE et al., 2003).

Toxinose estafilocócica é o nome dado à condição clínica causada pela ingestão de alimento contendo enterotoxinas produzidas por algumas linhagens de *Staphylococcus* enterotoxigênicos, sendo *S. aureus* o principal agente. Entretanto, outras espécies enterotoxigênicas, como *S. intermedius* e *S. hyicus*, podem estar envolvidas (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; SILVA et al., 2000, 2003). Embora a produção de enterotoxinas esteja geralmente associada a *S. aureus* coagulase e termonuclease positivas, algumas espécies que não produzem nenhuma dessas enzimas também podem produzir enterotoxinas (JAY, 2005). De acordo com Pereira, Carmo e Pereira (2001) espécies coagulase negativas, capazes de produzir toxinas, foram evidenciadas em estudos.

Os sintomas ocorrem entre 2 e 4 horas após a ingestão da toxina pré-formada no alimento e os mais comuns são vômitos, náuseas, dores abdominais e diarreia. Os casos de óbito são raros, embora a reposição de eletrólitos possa ser necessária para compensar a perda de fluidos. Porém, existem registros de morte por toxinose estafilocócica em idosos, crianças e pessoas severamente debilitadas (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989; ICMSF, 1996).

Embora 0,1-1,0 µg/kg da toxina possa causar sintomas em humanos, o tempo de aparecimento e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de toxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Em razão da curta duração da enfermidade, poucos casos são reportados e somente surtos que envolvem grande número de pessoas ganham atenção das autoridades (BRYAN, 1980; ICMSF, 1996).

Os estafilococos são amplamente distribuídos na natureza, sendo o homem e os animais os principais reservatórios (BANNERMAN, 2003). Os alimentos comumente associados a surtos de toxinose estafilocócica são as carnes e seus derivados, saladas, produtos de confeitarias e produtos lácteos e derivados (ICMSF, 1996).

Em muitos surtos estafilocócicos relacionados ao consumo de carne, os fatores que mais predispõem à contaminação originam-se da inadequada manipulação dos produtos, resultando em contaminação cruzada (manipuladores de alimentos, alimento cru e alimento contaminado) e na exposição dos produtos a temperaturas adequadas ao crescimento do microrganismo (HOFFMANN et al., 1996; PARDI et al., 2001).

2.3.6 *Listeria monocytogenes*

As espécies do gênero *Listeria* são representadas por pequenos bastonetes Gram-positivos, não esporogênicas, catalase positivas, oxidase negativas, encapsuladas, aeróbias facultativas e móveis devido a flagelos peritríquios (HOLT et al., 1994). Crescem numa ampla faixa de temperatura (-0,4 a 50°C), com crescimento ótimo entre 30 e 37°C e são classificadas como psicrotróficas, em função da capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. A faixa de pH para crescimento situa-se entre 5,6 e 9,6, mas seu crescimento já foi constatado em pH abaixo de 4,0. A atividade de água ótima é

maior que 0,97 com a mínima variando entre 0,90-0,93 e toleram altas concentrações de cloreto de sódio (10-12%), sobrevivendo a 25,5% de NaCl (JAY, 2005).

A multiplicação desse microrganismo é estimulada pelo Fe^{3+} e fenilalanina, tendo como requerimentos primários para seu desenvolvimento a glicose e a glutamina. A utilização de glicose em condições aeróbias resulta na produção de lactato, acetato e acetoína. Por serem aeróbias facultativas, essas bactérias também podem se desenvolver em atmosferas modificadas (ROCOURT, 1999).

Listeria monocytogenes é notável por sua habilidade em crescer sob temperatura de refrigeração, ao contrário da maioria dos outros patógenos entéricos (PAL; LABUZA; DIEZ-GONZALEZ, 2008). Isso tem uma importância considerável para a segurança alimentar, pois significa que o resfriamento a 4°C não impede o crescimento do microrganismo em níveis perigosos, sendo destruído apenas pela pasteurização ou cozimento adequado (RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009).

O gênero *Listeria* é composto por 6 espécies reconhecidas: *L. monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi* e *Listeria murrayi* (SEELIGER; JONES, 1996), sendo encontrado em vários tipos de mamíferos, aves, peixes, anfíbios e insetos, na maioria das vezes portadores assintomáticos que liberam a bactéria nas fezes, sem desenvolver infecções (RYSER; DONNELLY, 2001).

A ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* pode resultar em doenças graves, como a listeriose, que afeta o trato gastrointestinal e sistema nervoso, podendo levar ao aborto espontâneo em mulheres grávidas (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Dentre os alimentos envolvidos, destacam-se leite, queijos, sorvetes, água, vegetais crus, patês de carnes, molhos de carne crua fermentada, aves cruas ou cozidas, peixes e frutos do mar (INFORME-NET

DTA, 2003). Em produtos cárneos, condições de elevada temperatura e lenta produção de ácido podem favorecer a multiplicação desse microrganismo (SCHILLINGER; GEISEN; HOLZAPFEL, 1996).

Os sintomas mais comuns são febre, fadiga, mal-estar, podendo haver ou não presença de náusea, vômito e diarreia. Em casos mais graves, ocorre meningite, meningoencefalite, encefalite e septicemia. Em indivíduos saudáveis, a doença é pouco frequente e manifesta-se como gastroenterite, caracterizada por febre, vômitos, dor abdominal e diarreia (DONELLY, 2001).

As bactérias, após cruzarem a barreira intestinal, alcançam o fígado – replicando nos hepatócitos – e também o baço, através da linfa e do sangue. Em seguida, a disseminação via hematogênica pode atingir o cérebro e a placenta. A doença ocorre, portanto, em razão da propriedade original de *L. monocytogenes* ser capaz de atravessar três barreiras: a intestinal, a hematoencefálica e a materno-fetal. E também devido à capacidade de *Listeria* em resistir à morte intracelular quando fagocitada por macrófagos e por invadir muitos tipos de células que são normalmente não fagocíticas (COSSART; TOLEDO-ARANA, 2008).

2.3.7 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* é composto por bactérias pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, caracterizadas como bastonetes Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, oxidase e catalase positivas, obrigatoriamente aeróbias e móveis por flagelos polares (HOLT et al., 1994).

De um modo geral, as cepas de *Pseudomonas* são capazes de sobreviver em substratos com pequenas quantidades de nutrientes, crescendo quimiorganotroficamente em pH neutro e temperaturas mesofílicas. No entanto,

a temperatura ótima de crescimento da maioria das estirpes é de, aproximadamente, 28°C (JAY, 2005).

O gênero *Pseudomonas* está amplamente difundido na natureza, compreendendo mais de 100 espécies, sendo a de maior importância a *Pseudomonas aeruginosa*, por se tratar de um patógeno secundário e oportunista com grande capacidade invasiva e toxigênica (JAY, 2005).

Pseudomonas aeruginosa tem sido responsável pela maioria dos casos de doença infecciosa no homem, como: infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e diversos outros tipos de infecção, especialmente em indivíduos imunossuprimidos, nos idosos e nas crianças (MACFADDIN, 1980).

Em relação aos alimentos comumente contaminados por essa bactéria, destaca-se a carne fresca, uma vez que sua microbiota é constituída por microrganismos Gram-negativos, incluindo bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (BARBUTI; PAROLARI, 2000).

2.3.8 *Bacillus cereus*

De acordo com o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, a bactéria *B. cereus* é descrita como um bastonete longo, Gram-positivo, formador de esporos, aeróbia facultativa, catalase positiva, além de possuir motilidade por meio de flagelos peritríquios (HOLT et al., 1994).

De um modo geral, cepas típicas de *B. cereus* são mesófilas, multiplicando-se em temperaturas entre 10 e 48°C, com faixa ótima situada entre 28 e 35°C; desenvolvem-se em alimentos com atividade de água igual ou superior a 0,95 e multiplicam-se na faixa de pH entre 4,3 e 9,3 (JAY, 2005).

A espécie é largamente distribuída na natureza, sendo o solo o seu reservatório natural. Por essa razão, contamina facilmente alimentos como

vegetais, cereais e tubérculos. Nesse contexto, o arroz merece destaque, uma vez que tem sido o alimento frequentemente envolvido em surtos de origem alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Diversos tipos de alimentos têm sido relacionados às doenças alimentares atribuídas a esse microrganismo, sendo os surtos diarreicos frequentemente relacionados ao consumo de alimentos ricos em proteínas, como carnes e pescado (BENNETT; BELAY, 2001; VALERO et al., 2002).

As doenças alimentares relacionadas à *B. cereus* manifestam-se, classicamente, sob duas formas clínicas: a síndrome diarreica e a síndrome emética. Os principais sintomas da síndrome diarreica são dores abdominais e diarreia intensa, raramente ocorrendo náuseas ou vômitos. A duração da doença é de 12 a 24 horas, e o período de incubação varia entre 8 e 16 horas (GRANUM, 1994). A síndrome emética é uma toxiose alimentar caracterizada por um período de incubação de 1 a 5 horas, seguido por vômitos e náuseas, com 6 a 24 horas de duração. Geralmente, tanto o quadro emético como o diarreico apresentam baixa gravidade, com resolução em 24 horas, não necessitando de cuidados médicos (LUND; DE BUYSER; GRANUM, 2000; MAHLER et al., 1997).

Além das doenças de origem alimentar, *B. cereus* pode causar algumas infecções sistêmicas e locais, como septicemia, meningite e infecções oculares. Essas infecções são pouco frequentes e, geralmente, estão associadas às hemolisinas e fosfolipases produzidas pelo microrganismo (DROBNIIEWSKI, 1993; NOTERMANS; BATT, 1998).

2.3.9 *Campylobacter* spp.

O gênero *Campylobacter*, pertencente à família *Campylobacteriaceae*, compreende bactérias Gram-negativas, não esporogênicas, em formato de

bastonetes curvos espiralados, com uma ou mais espirais. Apresentam arranjo típico em forma de “S”, são móveis, exceto *Campylobacter gracilis*, apresentando motilidade característica em movimentos tipo saca-rolha ou vaivém (VANDAMME et al., 2005).

De maneira geral, as cepas de *Campylobacter* são microaerófilas e capnofílicas, requerendo baixas concentrações de oxigênio (3-15%) e altas concentrações de CO₂ (3-5%) para o crescimento. O metabolismo energético é oxidativo e são oxidase positivas, exceto *C. gracilis* e algumas cepas de *Campylobacter concisus* e *Campylobacter showae*. Multiplicam-se em temperaturas entre 35 e 37°C e sua temperatura ótima varia entre as espécies na faixa de 30 a 42°C (JAY, 2005).

As espécies de *Campylobacter* associadas a doenças transmitidas por alimentos (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis*) constituem um grupo distinto no gênero *Campylobacter*, chamado de termotolerantes. Caracteristicamente, essas espécies apresentam temperatura ótima de crescimento na faixa de 42-43°C e não crescem abaixo de 30°C (PEARSON; HEALING, 1992; STANLEY; JONES, 2003).

As doenças de origem alimentar provocadas por *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* incluem gastroenterite, septicemia, meningite, aborto e síndrome de Guillain-Barré. A doença causada por essa espécie é chamada de campilobacteriose, enterite por *Campylobacter* ou gastroenterite. O período de incubação é de 2 a 5 dias; a duração, em geral, é de 7 a 10 dias e reincidências não são incomuns. O principal sintoma é diarreia líquida ou com muco, contendo sangue e leucócitos fecais. Outros sintomas são febre, dor abdominal, náusea, dor de cabeça e dores musculares. A maior parte das infecções é autolimitada e não necessita de tratamento com antibióticos (INFORME-NET DTA, 2003; WHO, 2000).

As cepas de *Campylobacter* são amplamente distribuídas em animais de sangue quente, domésticos e silvestres. São prevalentes em frangos, bovinos, suínos, ovinos e em animais de estimação, como cães e gatos. A principal rota de transmissão é o consumo de alimentos contaminados, principalmente carne mal cozida, produtos cárneos e leite cru. Água contaminada não tratada também é uma fonte reconhecida de infecção (INFORME-NET DTA, 2003; WHO, 2000).

2.4 Antimicrobianos

O aumento da resistência antimicrobiana em bactérias e suas possíveis implicações para a saúde pública têm levado a uma maior preocupação quanto ao uso de agentes antimicrobianos (LIMA et al., 2006).

O uso intensivo de antibióticos na medicina humana, na prática animal para terapia e como promotores de crescimento é considerado como a principal razão para o desenvolvimento de resistência bacteriana a antibióticos (BARTON, 2000; SENGELOV et al., 2003).

Para facilitar a produção intensiva de animais, antibióticos são utilizados continuamente na dieta em níveis subterapêuticos com a finalidade de promover o crescimento, aumentar a eficácia da alimentação e prevenir doenças (JINDAL et al., 2006; KHACHATOURIANS, 1998; WEGENER, 2003). No entanto, o uso constante e, na maioria das vezes, indiscriminado desses agentes na produção animal geralmente contribui para o aumento da incidência dessa resistência em bactérias comensais e patogênicas (AARESTRUPP; OLIVER DURAN; BURCH, 2008; HAMMERUM; HEUER, 2009; LIMA et al., 2006).

As bactérias provenientes de alimentos de origem animal apresentam, frequentemente, resistência a uma gama de agentes antimicrobianos comumente utilizados em seres humanos, sendo possível que esses microrganismos

resistentes sejam transferidos para o homem, quer seja por meio da cadeia alimentar ou indiretamente pela propagação de resíduos animais nos campos (GHOSH; LAPARA, 2007; HAMMERUM; HEUER, 2009). E, para que as bactérias resistentes a antimicrobianos passem pela cadeia alimentar, elas precisam sobreviver como contaminantes durante o abate, o processamento de alimentos e a comercialização (DELSOL et al., 2010).

Dessa forma, a presença de bactérias resistentes em alimentos de origem animal, como a linguiça, pode possibilitar a troca de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons codificadores de resistência a antimicrobianos, facilitando a rápida disseminação entre as bactérias (ALEKSHUN; LEVY, 1999; SLAMA et al., 2010).

Dependendo da virulência do microrganismo envolvido, a ingestão de alimentos contaminados com bactérias resistentes pode levar a doenças humanas que requerem tratamentos mais complexos, além da possível transferência de genes de resistência às bactérias da microbiota humana (ACAR; ROSTEL, 2001; AUBRY-DAMON et al., 2004).

2.5 Conservantes em alimentos

O interesse na biopreservação de sistemas alimentares tem aumentado, por isso novos compostos antimicrobianos naturais de diferentes origens estão sendo utilizados e desenvolvidos (THERON; LUES, 2007).

A utilização de agentes na prevenção da deterioração de alimentos tem sido investigada, incluindo os metabólitos microbianos (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos) e alguns conservantes, como nitrato e nitrito de sódio e de potássio (LAVERMICOCCA; VALERIO; VISCONTI, 2003).

2.5.1 Nitrato e nitrito

Sais de cura, como nitrato e nitrito de sódio e de potássio, são largamente utilizados como aditivos alimentares no processamento de produtos cárneos. Os sais de nitrito, além de conservarem a carne contra a deterioração bacteriana, são fixadores de cor e agentes de cura, contribuindo também para o desenvolvimento de sabor (LEITÃO, 1978).

No entanto, o uso desses aditivos é altamente discutido em virtude da possibilidade de originarem compostos nitrosos de ação carcinogênica, como a N-nitrosodimetilamina e a monometilnitrosamina (SCHVARTSMAN, 1990).

A aplicação desses sais acima do limite máximo estabelecido pela legislação vigente pode acarretar sérios riscos à saúde humana, pela possibilidade de manifestações de efeitos tóxicos agudos e crônicos. O nitrito ingerido em excesso, uma vez absorvido, pode agir sobre a hemoglobina e originar a metamioglobina, impedindo que ela exerça a função normal de transportar oxigênio (HILL, 1999).

A reação do íon nitrito com aminas e amidas presentes no meio pode dar origem às nitrosaminas e nitrosamidas, substâncias consideradas carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (EICHHOLZER; GUTZWILLER, 1998).

Em razão do exposto, é imprescindível estabelecer medidas preventivas substanciais para efetivar o controle de qualidade e a vigilância sanitária, objetivando minimizar os efeitos tóxicos causados pelos aditivos alimentares, especialmente em grupos mais susceptíveis como crianças, idosos, gestantes e enfermos (HIRSCHBRUCH et al., 1999).

A legislação brasileira vigente prevê limites máximos de 0,015 g/100 g e 0,03 g/100 g, respectivamente para nitrito e nitrato de sódio, para carnes e produtos cárneos, sendo esses produtos denominados como conservantes (BRASIL, 1998).

2.5.2 Ácidos orgânicos

Como os ácidos orgânicos podem inibir o crescimento da maioria dos microrganismos e ocorrem naturalmente nos alimentos, eles estão cada vez mais sendo usados em produtos alimentícios como conservantes, aumentando, assim, a vida útil de produtos alimentares perecíveis (NAKAI; SIEBERT, 2003; RICKE, 2003).

Esses ácidos são, geralmente, subprodutos fermentativos de microrganismos ubíquos como as bactérias do ácido láctico, que produzem o ácido láctico como principal substância antimicrobiana e bioconservativa (CASEY; CONDON, 2002). Podem ocorrer naturalmente como constituintes do alimento ou ser adicionados diretamente ou indiretamente aos produtos (THERON; LUES, 2007).

Os ácidos orgânicos existem sob duas formas básicas, ácido puro ou ácido tamponado. Os ácidos puros são o ácido láctico, ácido propiônico, ácido acético, ácido cítrico e ácido benzoico, enquanto o cálcio e os sais de sódio dos ácidos propiônico, acético, cítrico e benzoico são considerados ácidos orgânicos tamponados (THERON; LUES, 2007).

Alguns dos ácidos orgânicos, como os ácidos láctico, acético, propiônico, cítrico e benzoico, vêm sendo utilizados como conservantes de alimentos com ação inibitória sobre a microbiota encontrada na carne (BÉGIN; VAN CALSTEREN, 1999; NAZER et al., 2005).

O ácido láctico está presente em vários processos bioquímicos, bem como na produção de produtos lácteos, como queijo e iogurte. Já o ácido acético é produzido naturalmente durante a deterioração de frutas e de outros alimentos pela bactéria *Acetobacter*, que é encontrada normalmente nos alimentos, na água e no solo. *Acetobacter* deriva sua energia a partir da oxidação do etanol a ácido

acético durante a respiração e também é usada, especificamente, na produção de vinagre (THERON; LUES, 2007).

Embora o mecanismo antibacteriano de ácidos orgânicos não seja totalmente compreendido, eles são capazes de exibir propriedades bacteriostáticas e bactericidas dependendo do estado fisiológico do microorganismo e das características físico-químicas do ambiente externo (RICKE, 2003).

A maioria dos ácidos orgânicos tem uma vantagem em razão da sua estrutura simples e do seu pequeno tamanho ou massa molecular, o que lhes permite circular livremente, quando na forma não dissociada, em toda a célula (THERON; LUES, 2007).

Quando utilizados como conservantes em alimentos, permanecem em um equilíbrio pH-dependente entre o estado não dissociado e dissociado (BRUL; COOTE, 1999). O estado não dissociado da molécula é o principal responsável pela atividade antimicrobiana e é mais prevalente em pH baixo (ASLIM et al., 2005; NAZER et al., 2005). Acredita-se que a ação inibitória é um resultado do composto no estado não dissociado, podendo livremente atravessar a membrana plasmática para entrar na célula bacteriana. Uma vez dentro da célula, a molécula encontra um pH mais alto e se dissocia, resultando na liberação de ânions carregados e prótons, inibindo, assim, reações metabólicas (BRUL; COOTE, 1999; CHERRINGTON et al., 1991; DAVIDSON, 2001; RUSSEL, 1992).

Vários estudos confirmam a efetiva ação antibacteriana dos ácidos orgânicos e seus sais, isolados ou associados a outros métodos, em carnes e produtos cárneos (DIEZ et al., 2008; DUBAL et al., 2004; GREER; DILTS, 1995; MBANDI; SHELEF, 2002; RICKE, 2003; SCHIRMER; LANGSRUD, 2010; SMULDERS; GREER, 1998). Na legislação brasileira, os ácidos lático e

acético são permitidos como acidulantes na elaboração de produtos cárneos (BRASIL, 2006).

REFERÊNCIAS

AARESTRUPP, F. M.; OLIVER DURAN, C.; BURCH, D. G. Antimicrobial resistance in swine production. **Animal Health Research Reviews**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 135-148, Dec. 2008.

ACAR, J.; ROSTEL, B. Antimicrobial resistance: an overview. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 20, n. 3, p. 797-810, Dec. 2001.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 7, n. 10, p. 410-413, Oct. 1999.

ARAGON-ALEGRO, L. C. et al. Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 6, p. 630-634, June 2007.

ASLIM, B. et al. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **LTW/Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 38, n. 6, p. 691-694, Sept. 2005.

AUBRY-DAMON, H. et al. Antimicrobial resistance in commensal flora of pig farmers. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 5, p. 873-879, May 2004.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Review staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct. 2000.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R. et al. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8th ed. Washington: American Society Microbiology, 2003. v. 1, cap. 28, p. 384-404.

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Causes and prevention of dry-cured ham defects. In: II SYMPOSIUM INTERNATIONAL DEL JAMÓN CURADO, 2000, Barcelona. **Anais...** Barcelona, 2000. p. 19-25.

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. **Meat Science**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 323-329, Nov. 2002.

BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 279-299, Dec. 2000.

BATISTA, D. J. C.; SILVA, W. P.; SOARES, G. J. D. Efeito da distância de transporte de bovinos no metabolismo *post-mortem*. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 2, p. 152-156, maio/ago. 1999.

BÉGIN, A.; VAN CALSTEREN, M. R. Antimicrobial films produced from chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 63-67, Oct. 1999.

BENENSON, A. S. **Control of Communicable Diseases Manual**. 16th ed. Washington: American Public Health Association, 1995.

BENNETT, R. W; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 32, p. 311-316.

BERSOT, L. S. et al. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, Oxford, v. 57, n. 1, p.13-17, Jan. 2001.

BOYD, E. F. et al. Molecular genetic relationships of the salmonellae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 804-808, Mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 2244, de 4 de junho de 1997. Altera dispositivos do Decreto 30691, de 29 de março de 1952, que aprovou o regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 11555, 05 jun. 1997. Seção 1.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998. Aprova regulamento técnico: “Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carne e produtos cárneos”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 mar. 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos>>. Acesso em: 22 jun. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de linguiça. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 6, 05 abr. 2000. Seção 1.

BRASIL. Centro de Vigilância Sanitária – Divisão de Doenças e Transmissão Hídrica e Alimentar. **Manual de Doenças Transmitidas por Alimentos. *Escherichia coli* O157:H7 – enterohemorrágica**. São Paulo, 2002. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 15 jan. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006. Dispõe sobre o regulamento técnico de atribuição de aditivos, e seus limites das seguintes categorias de alimentos 8: carne e produtos cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 14, 4 jan. 2007. Seção 1.

BRUL, S.; COOTE, P. Review: preservative agents in foods – Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 1-17, Sept. 1999.

BRYAN, F. L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 43, n. 2, p. 140-150, Feb. 1980.

BUCHANAN, R. L.; DOYLE, M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. **Food Technology**, Chicago, v. 51, n. 10, p. 69-76, Oct. 1997.

CAPITA, R. et al. Occurrence of salmonellae in retail chicken carcasses and their products in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 169-173, Mar. 2003.

CASEY, P. G.; CONDON, S. Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 199-206, June 2002.

CHERRINGTON, C. A. et al. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 32, p. 87-108, 1991.

CHOKESAJJAWATEE, N. et al. Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 5, p. 547-551, Aug. 2009.

COSSART, P.; TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 9, p. 1041-1050, July 2008.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLW, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 2001. cap. 29, p. 593-627.

DELSOL, A. A. et al. Persistence of a wild type *Escherichia coli* and its multiple antibiotic-resistant (MAR) derivatives in the abattoir and on chilled pig carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2-3, p. 249-253, June 2010.

DESMARCHELIER, P. et al. Managing safety and quality through the red meat chain. **Meat Science**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 28-35, Sept. 2007.

DIEZ, A. M. et al. Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 1, p. 154-161, Feb. 2008.

DONELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M. D.; GORHAM, J. R. (Ed.). **Foodborne Disease Handbook**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2001. v. 1, cap. 10, p. 213-246.

DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, n. 4, p. 324-338, Oct. 1993.

DUBAL, Z. B. et al. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. **Meat Science**, Oxford, v. 66, n. 4, p. 817-821, Apr. 2004.

EICHHOLZER, M.; GUTZWILLER, F. Dietary nitrates, nitrites, and N-nitroso compounds and cancer risk: a review of the epidemiologic evidence. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 56, n. 4, p. 95-105, Apr. 1998.

ESCARTIN, E. F. et al. Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. **Food Microbiology**, London, v. 16, n. 5, p. 479-486, Oct. 1999.

FDA/CFSAN. **Bad Bug Book**. *Streptococcus* spp. 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap21.html>>. Acesso em: 25 mar. 2011.

FERREIRA, V. et al. Characterisation of *alheiras*, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 436-440, May 2007.

FOODNET data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 sites, United States, 2004. **Morbidity and Mortality and Weekly**, rep., v. 54, n. 14, p. 352-356, 2005.

FSIS – FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. **Progress report on *Salmonella* testing of raw meat and poultry products, 1998-2002**. Disponível em: <www.fsis.usda.gov/ohps/haccp/salm5year.htm>. Acesso em: 30 abr. 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRANCO, B. D. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-15, Jan. 2007.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2001. v. 1, p. 119-166.

GHOSH, S.; LAPARA, T. M. The effect of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, London, v. 1, n. 3, p. 191-203, May 2007.

GIOMBELLI, A. Método tradicional clássico para detecção de *Salmonella* em alimentos: um problema técnico bastante complexo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68-69, p. 58-61, jan./fev. 2000.

GRANUM, P. E. *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 23, p. 61-66, June 1994.

GREER, G. G.; DILTS, B. D. Lactic acid inhibition of the growth of spoilage bacteria and cold tolerant pathogens on pork. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 141-151, Apr. 1995.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 4, p. 267-282, 1989.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 916-921, Apr. 2009.

HILL, M. J. Nitrate toxicity: myth or reality? **British Journal of Nutrition**, London, v. 81, n. 5, p. 343-344, 1999.

HIRSCHBRUCH, M. D. et al. Natural X Seguro: compilação de substâncias tóxicas naturalmente presentes nos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 62, p. 28-33, jun. 1999.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 1687 p.

HOFFMANN, F. L. et al. Análise microbiológica e sensorial de linguiça de frango produzida artesanalmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 49-58, jan./jun. 1996.

HWANG, S. Y. et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 99-105, June 2007.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods 5**. Characteristics of microbial pathogens. London: Springer, 1996. 524 p.

INFORME-NET DTA. *Listeria monocytogenes*/listeriose. **Manual das Doenças Transmitidas por Alimentos**. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/hm/hídrica/Listeria.htm>>. Acesso em: 16 jan. 2011.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp. ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista Instituto Adolf Lutz**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JINDAL, A. et al. Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7813-7820, Dec. 2006.

KHACHATOURIANS, G. G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 159, n. 9, p. 1129-1136, Nov. 1998.

KWOK A. Y. C.; CHOW A. W. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial *hsp60* gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 1, p. 87-92, Jan. 2003.

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

LABBE, R. G. *Clostridium perfringens*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examinations of Foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 34, p. 325-330.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; VISCONTI, A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 634-640, Jan. 2003.

LEITÃO, M. F. F. Microrganismos patogênicos na carne e derivados. **Boletim do ITAL**, Campinas, v. 59, p. 15-48, set./out. 1978.

LETERTRE, C. et al. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 38-43, 2003.

LIMA, R. M. S. et al. Resistência a antimicrobianos de bactérias oriundas de ambiente de criação e filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 126-132, jan./fev. 2006.

LISERRE, A. M. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strains in modified atmosphere-packaged brazilian sausage. **Meat Science**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 449-455, Aug. 2002.

LITTLE, C. L. et al. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 538-543, May 2008.

LUND, T.; DE BUYSER, M. L.; GRANUM, P. E. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 254-261, Oct. 2000.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527 p.

MAGNANI, A. L. et al. Incidência de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em carne suína *in natura* e salame colonial, consumidos pela população de Chapecó-SC. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 73, p. 44-47, jun. 2000.

MAHLER, H. et al. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 336, n. 16, p. 1142-1148, Apr. 1997.

MANHOSO, F. F. R. Aspectos químicos e microbiológicos das linguiças tipo frescal no Brasil. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 230, p. 90-92, 1996.

MARQUES, S. et al. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1120-1123, nov./dez. 2006.

MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1-2, p. 119-126, June 1998.

MARTINS, S. C. S. et al. "Screening" de linhagens de *Escherichia coli* multirresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal no estado do Ceará, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104-105, p. 71-76, jan./fev. 2003.

MATARAGAS, M. et al. Modeling and predicting spoilage of cooked, cured meat products by multivariate analysis. **Meat Science**, Oxford, v. 77, n. 3, p. 348-356, Nov. 2007.

MBANDI, E.; SHELEF, L. A. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 191-198, June 2002.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. **Microbiología de los Alimentos** – fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Zaragoza: Acriba, 1993. 375 p.

NAKAI, S. A.; SIEBERT, K. J. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 249-255, Sept. 2003.

NAZER, A. I. et al. Combinations of food antimicrobials at low-levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 5, p. 391-398, Oct. 2005.

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 51-61, July 1998.

OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M.; CARVALHO, J. C. A. P. Clostrídios em condimentos utilizados em embutidos cárneos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 1, n. 1, p. 1-5, 1994.

PAL, A.; LABUZA, T. P.; DIEZ-GONZALEZ, F. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 460-470, May 2008.

PARDI, M. C. et al. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. 2. ed. Goiânia: Editora UFG, 2001. v. 2.

PATHANIA, A. et al. Antimicrobial activity of commercial marinades against multiple strains of *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 3, p. 214-217, May 2010.

PEARSON, A. D.; HEALING, T. D. The surveillance and control of *Campylobacter* infection. **Communicable Disease Review**, London, v. 2, n. 12, p. 133-139, Nov. 1992.

PELISSER, M. R. et al. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 145-148, Jan./Mar. 2009.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 171-175, maio/ago. 2001.

POPPE, C. *Salmonella enteritidis* in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 1-2, p. 1-5, Jan. 1994.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, Menasha, v. 82, n. 4, p. 632-639, Apr. 2003.

RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 4, p. 357-376, June 2009.

ROCOURT, J. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H. (Ed.). **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 1-20.

RUSSEL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, n. 5, p. 363-370, Nov. 1992.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 36, p. 343-356.

SAMELIS, J. et al. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, Fort Collins, v. 38, n. 1, p. 21-28, Feb. 2005.

SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 7, n. 5, p. 158-164, May 1996.

SCHIRMER, B. C.; LANGSRUD, S. A dissolving CO₂ headspace combined with organic acids prolongs the shelf-life of fresh pork. **Meat Science**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 280-284, June 2010.

SCHVARTSMAN, S. **Manual sobre intoxicações alimentares**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Pediatria, 1990. 47 p.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S. SHAPE, M. E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willians e Wilkins, 1996. v. 2, p. 1235-1245.

SENGELOV, G. et al. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. **Environment International**, Amsterdam, v. 28, n. 7, p. 587-595, Jan. 2003.

SILVA, W. P. et al. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 103-106, Apr./June 2000.

SILVA, W. P. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 125-127, Nov. 2003.

SLAMA, K. B. et al. Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 281-286, Feb. 2010.

SMULDERS, F. J. M.; GREER, G. G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p. 149-169, Nov. 1998.

SPRICIGO, D. A. et al. Prevalence and profile of resistance to antimicrobials of *Salmonella* serovars isolated from raw pork sausage in Lages, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 517-520, Apr. 2008.

STAGNITTA, P. V.; MICALIZZI, B.; GUZMÁN, A. M. S. Prevalence of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meats in San Luis, Argentina. **Anaerobe**, San Luis, v. 8, n. 5, p. 253-258, Oct. 2002.

STANLEY, K.; JONES, K., Cattle and sheep farms as reservoir of *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p.104-113, 2003.

THERON, M. M.; LUES, J. F. R. Organic acids and meat preservation: a review. **Food Reviews International**, New York, v. 23, n. 2, p.141-158, Mar. 2007.

VALERO, M. et al. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 5, p. 491-499, Oct. 2002.

VANDAMME, P. et al. Genus I. *Campylobacter*. In: BRENNER, D. J. et al. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. New York: Springer, 2005. v. 2.

VARNAN, A. H.; EVANS, M. G. **Foodborne Pathogens**. An illustrated text. London: Marison Publishing, 1996. 501 p.

WEGENER, H. C. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, n. 5, p. 439-445, Oct. 2003.

WHO – World Health Organization. *Campylobacter*. **Fact Sheet n° 255**. 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 25 mar. 2011.

CAPÍTULO 2

Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de linguiça suína frescal

RESUMO

Linguiças frescal constituem-se em potenciais veículos de microrganismos patogênicos, sendo, frequentemente, associadas a enfermidades transmitidas por alimentos. O presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar a qualidade microbiológica das linguiças; identificar os isolados bacterianos por meio do sequenciamento da região 16S rDNA; selecionar bactérias com perfil de multirresistência a antimicrobianos; selecionar o ácido orgânico com maior eficácia na inibição de bactérias multirresistentes; e elaborar linguiças suína frescal inoculadas com cepas multirresistentes de bactérias distintas para a avaliação da inibição dos patógenos pelo ácido láctico. Vinte amostras de linguiça suína frescal industrial, de marcas distintas, foram adquiridas em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais. Análises microbiológicas para a avaliação da qualidade do produto foram realizadas. Para o teste de sensibilidade a antimicrobianos, utilizou-se o método disco-difusão em ágar. Estirpes com perfil de multirresistência foram submetidas, isoladamente, aos testes de determinação da concentração mínima inibitória e determinação da concentração mínima bactericida, utilizando-se os ácidos láctico e acético, em oito concentrações cada. Linguiças suína frescal foram elaboradas com a inoculação de bactérias patogênicas distintas e acrescidas de ácido láctico nas concentrações de 1,5 e 4,0 M, sendo armazenadas a 4°C por um período de 15 dias. Os resultados indicaram a contaminação das amostras por *Salmonella* Typhi, *S. Typhimurium* e *S. Paratyphi*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus xylosum* e *S. epidermidis*. Vinte e um isolados apresentaram índice MAR igual ou superior a 0,5 e foram considerados multirresistentes aos antimicrobianos testados. No teste de determinação da concentração mínima bactericida, o ácido láctico mostrou-se mais eficaz na inibição dos patógenos que o ácido acético. Na matriz alimentar com adição das linhagens de bactérias, o tratamento com ácido láctico, nas concentrações de 1,5 e 4,0 M, reduziu ligeiramente a população dos patógenos ao longo do tempo de estocagem.

Palavras-chave: Bactérias patogênicas. Resistência antimicrobiana. Ácidos orgânicos.

ABSTRACT

Fresh sausages are potential vehicles for pathogenic microorganisms, what frequently associate them with diseases transmitted by food. This work aimed to evaluate the microbiological quality of the sausages; to identify bacterial isolates through the sequencing of the region 16S of rDNA; to select bacteria with antimicrobial multiresistance profile; to select the organic acid with better efficiency in the multiresistance bacterial inhibition; and to elaborate fresh pork sausages inoculated with different multiresistant bacteria strains in order to evaluate the inhibition of pathogens by lactic acid. Twenty industrial fresh pork sausage samples, from diverse trademarks, were purchase from various places located in Minas Gerais State. Microbiological analyses to the evaluation of the quality of the product were performed. To the antimicrobial sensitivity test, the disk diffusion agar method was used. Strains with multiresistance profile were submitted, individually, to minimum inhibitory concentration test and to minimum bactericidal concentration test, by using lactic and acetic acids, in eight concentrations each. Fresh pork sausages were made with the inoculation of different pathogenic bacteria, lactic acid was added in 1.5 and 4.0 M concentrations, stored under 4°C within 15 days. The results showed the contamination of the samples by *Salmonella* Typhi, *S. Typhimurium* and *S. Paratyphi*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus xylosus* and *S. epidermidis*. Twenty-one isolates present MAR index equal or superior to 0.5 and were considered multiresistant to the tested antimicrobials. In the minimum bactericidal concentration test, the lactic acid was proved more efficient in the pathogen inhibition than the acetic acid. Concerning the food matrix with addition of the bacterial lineages, the lactic acid treatment, in the concentrations of 1.5 and 4.0 M, slightly reduced the population of pathogens during the storage period.

Keywords: Pathogenic bacteria. Antimicrobial resistance. Organic acids.

1 INTRODUÇÃO

A carne e seus derivados, incluindo as linguiças frescal, estão entre os alimentos de grande preocupação para a saúde pública, uma vez que se apresentam como potenciais veículos de bactérias patogênicas, sendo, geralmente, implicados em surtos de toxinfecções alimentares (LISERRE et al., 2002; SAMELIS et al., 2005).

As características da composição química das carnes, como a presença de grande quantidade de água disponível, oferecem um substrato ideal para o desenvolvimento bacteriano. Dessa forma, os cuidados higiênico-sanitários durante o abate, o processamento e demais etapas de industrialização são imprescindíveis para a segurança microbiológica do produto (LABADIE, 1999).

A presença de diferentes patógenos em embutidos tem sido relatada, destacando-se *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens* e *Listeria monocytogenes* (BARBUTI; PAROLARI, 2002; JOHNSTON; TOMPKIN, 1992).

A resistência desses patógenos a agentes antimicrobianos é um fator preocupante. O uso constante e, muitas vezes, indiscriminado desses agentes na medicina humana, na prevenção de doenças e como promotores de crescimento em animais tem levado à aquisição de resistência pelas bactérias (BARTON, 2000; SENGELOV et al., 2003). Dessa forma, a multirresistência de bactérias a antibióticos constitui-se em grave problema para a saúde pública, uma vez que as opções para tratamentos de doenças em humanos tornam-se escassas.

A preservação da estabilidade microbiológica, da segurança sanitária e da qualidade dos produtos frescal deve ser baseada em obstáculos, incluindo o controle de crescimento e sobrevivência bacteriana, reduzindo, assim, a incidência de doenças veiculadas por alimentos.

Como alternativa para evitar a veiculação de estirpes patogênicas resistentes por meio dos alimentos, tem-se, como medida preventiva, a adição de ácidos orgânicos em linguiças.

De uma forma geral, os ácidos orgânicos podem inibir o crescimento da maioria dos microrganismos, sendo usados como conservantes em produtos alimentícios (NAKAI; SIEBERT, 2003; RICKE, 2003).

Embora o mecanismo antibacteriano dos ácidos orgânicos não seja totalmente compreendido, eles são capazes de exibir propriedades bacteriostáticas e bactericidas (RICKE, 2003). Esses ácidos, ao se dissociarem no citoplasma bacteriano, promovem acúmulo de ânions, que inibe reações metabólicas, e gasto de energia excessivo para expulsão de prótons. Os ácidos interferem, ainda, na estrutura da membrana citoplasmática, no transporte de nutrientes e na síntese de macromoléculas por alterar o pH intracelular bacteriano (CHERRINGTON et al., 1991; DAVIDSON, 2001; RUSSEL, 1992).

O ácido láctico, de acordo com a Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é permitido como acidulante para uso em embutidos frescal, tornando-se uma alternativa viável para a inibição de bactérias patogênicas em linguiças (BRASIL, 2006).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de linguiças frescal de carne suína, comercializadas no sul do Estado de Minas Gerais, e comparar com a legislação vigente; identificar isolados bacterianos por meio do sequenciamento da região 16S do rDNA; selecionar estirpes com perfil de multirresistência a antimicrobianos; selecionar, em testes *in vitro*, o ácido orgânico com maior eficácia na inibição de bactérias multirresistentes; e elaborar linguiças suína frescal inoculadas com cepas multirresistentes de bactérias distintas para testar a eficácia do ácido selecionado em inibir os patógenos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras

Amostras de linguiça suína frescal industrial (n = 20), de marcas distintas, foram adquiridas no varejo de diferentes localidades do Estado de Minas Gerais – Belo Horizonte, Betim, Lavras e São João del-Rei – durante o período de junho a agosto de 2010.

2.2 Análises microbiológicas

As amostras de linguiça, após transporte sob refrigeração em caixas isotérmicas, foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras para a realização das análises microbiológicas.

2.2.1 Preparo das amostras

A partir das amostras coletadas, 25 g de linguiça suína frescal industrial foram pesadas em condições assépticas, adicionadas a 225 mL de água peptonada 1%, acrescida de 0,5% de Tween 80, e homogeneizadas em Stomacher[®], durante 4 minutos (diluição 10^{-1}). Diluições decimais seriadas (10^{-2} a 10^{-8}) em água peptonada 1% foram obtidas. As análises microbiológicas foram realizadas segundo ICMSF (1992) e BRASIL (2003), com modificações.

2.2.2 Contagem total de aeróbios mesófilos

Para a contagem total de aeróbios mesófilos, realizou-se inoculação de alíquotas de 0,1 mL das diluições selecionadas na superfície do ágar padrão para contagem (PCA), em duplicata, com incubação das placas a 37°C por 24-48 horas. Após esse período, foram selecionadas as placas que apresentaram contagem entre 20 e 200 colônias para o cálculo das unidades formadoras de colônia, sendo os valores expressos em UFC/g.

2.2.3 Contagem total de enterobactérias

Para a quantificação de enterobactérias, realizou-se inoculação de alíquotas de 1 mL das diluições selecionadas em placas de Petri, em duplicata, e, em seguida, adicionou-se uma camada de ágar bile vermelho neutro cristal violeta com glicose (VRBG), pelo método de plaqueamento em profundidade. As placas foram incubadas a 37°C por 18-24 horas e, após esse período, foram selecionadas aquelas que apresentaram contagem entre 20 e 200 colônias para o cálculo das UFC/g.

Para a caracterização bioquímica, o número de isolados foi obtido pela raiz quadrada das colônias presentes, típicas da família *Enterobacteriaceae*. Após a obtenção da cultura pura, procedeu-se o teste de coloração diferencial de Gram e o teste de catalase para triagem dos isolados.

2.2.4 Enumeração de *Clostridium* sulfito-redutor

Para a enumeração de *Clostridium* sulfito-redutor, realizou-se inoculação de alíquotas de 0,1 mL das diluições selecionadas, em duplicata, na superfície do ágar triptose sulfito cicloserina (TSC), acrescido de emulsão de

gema de ovo e do suplemento TSC, contendo o antibiótico d-cicloserina. As placas foram incubadas a 37°C por 18-24 horas, em atmosfera anaeróbia, utilizando-se sachês AnaeroGen (Oxoid) como sistemas geradores de anaerobiose. Após incubação, realizou-se o cálculo de UFC/g.

2.2.5 Contagem total de *Streptococcus* spp.

Para a contagem de *Streptococcus* spp., realizou-se inoculação de alíquotas de 0,1 mL das diluições selecionadas, em duplicata, na superfície do ágar base Edwards modificado, acrescido de sangue de cavalo, com incubação das placas a 37°C por 48 horas. Após incubação, foram selecionadas as placas com contagens entre 20 e 200 colônias típicas, nas quais foram contadas as colônias que apresentaram halo de hemólise.

2.2.6 Contagem total de *Pseudomonas aeruginosa*

Para a contagem de *P. aeruginosa*, realizou-se inoculação de alíquotas de 0,1 mL das diluições selecionadas na superfície do ágar cetrimida base, em duplicata, acrescido do suplemento seletivo nalidixico, contendo ácido nalidixico, com incubação das placas a 37°C por 18-48 horas. Após incubação, realizou-se o cálculo de UFC/g.

2.2.7 Contagem total de *Bacillus cereus*

Para o isolamento de *B. cereus*, realizou-se inoculação de alíquotas de 0,1 mL das diluições selecionadas, em duplicata, na superfície do ágar seletivo para *Bacillus cereus* – manitol gema de ovo polimixina, acrescido de emulsão de gema de ovo e do suplemento seletivo polimixina B, contendo sulfato de

polimixina B. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Após incubação, realizou-se o cálculo de UFC/g.

2.2.8 Isolamento e identificação de *Staphylococcus* sp.

Para a enumeração de *Staphylococcus* sp., foi empregado o método de plaqueamento na superfície do ágar Baird-Parker, em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas e, após esse período, foram selecionadas aquelas que apresentaram contagem entre 20 e 200 colônias. Para realização dos testes complementares, o número de isolados foi obtido pela raiz quadrada das colônias típicas e atípicas e determinadas as unidades formadoras de colônias (UFC/g).

Para a triagem bioquímica, os isolados foram submetidos aos testes de coloração diferencial de Gram, catalase e coagulase. Foram selecionadas cinco cepas caracterizadas como cocos Gram-positivos, catalase e coagulase negativas, as quais foram submetidas à identificação por meio do kit API Staph (BioMérieux). A caracterização bioquímica foi realizada seguindo as instruções do fabricante, e a identificação final obtida pelo software API LAB PLUS (BioMérieux).

Os isolados característicos do gênero foram preservados em criotubos contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI), acrescidos de glicerol 50%, e armazenados à temperatura de -20°C.

2.2.9 Determinação de coliformes totais e termotolerantes e isolamento e identificação de *Escherichia coli*

A enumeração de coliformes (totais e termotolerantes) foi realizada utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) em séries de três tubos,

com a realização de testes presuntivos, em caldo lauril sulfato triptose (LST), e de teste confirmativo, para coliformes totais, em caldo verde brilhante bile 2% (VB).

Para o isolamento de *E. coli*, uma alçada da cultura proveniente dos tubos positivos de caldo *Escherichia coli* (EC), para coliformes termotolerantes, foi estriada na superfície do ágar levine eosina azul de metileno (EMB) com incubação das placas a 37°C por 24 horas. Após esse período, os isolados foram submetidos aos testes de coloração diferencial de Gram, catalase e oxidase. Em seguida, as cepas características de *E. coli* (bastonetes Gram-negativos, catalase positivas e oxidase negativas) foram submetidas às provas do IMViC – testes de indol, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e citrato.

As colônias que apresentaram perfil bioquímico característico de *E. coli* – indol (+) ou (-), VM (+), VP (-) e citrato (-) – foram submetidas à identificação por meio do kit API 20E (BioMérieux). A caracterização bioquímica foi realizada seguindo as instruções do fabricante, e a identificação final obtida pelo software API LAB PLUS (BioMérieux).

Os isolados característicos de *E. coli* foram preservados em criotubos contendo caldo BHI, acrescidos de glicerol 50%, e armazenados à temperatura de -20°C.

2.2.10 Pesquisa e identificação de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., procedeu-se a etapa de pré-enriquecimento em 225 mL de caldo base Salmosyst (peptona universal 10 g, cloreto de sódio 5 g, carbonato de cálcio 10 g e água destilada 1000 mL), sendo 25 g de cada amostra homogeneizadas em Stomacher[®], durante 4 minutos, com incubação a 37°C por 6 horas. A seguir, na etapa de enriquecimento, empregou-se o caldo tetrationato, acrescido de soluções de iodo e de verde brilhante com

incubação a 37°C por 18 horas. A partir de cada tubo, uma alçada foi estriada em ágar Rambach, por meio de estrias de esgotamento, com incubação das placas a 37°C por 24 horas. Colônias suspeitas foram transferidas para tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) e incubados a 37°C por 24 horas (PIGNATO et al., 1995).

Após incubação, os isolados típicos (reação em LIA caracterizada por rampa e fundo alcalinos, com ou sem produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), e reação em TSI distinguida por rampa alcalina e fundo ácido, com ou sem produção de H₂S) foram selecionados e submetidos aos testes de coloração diferencial de Gram, catalase e oxidase.

As colônias que apresentaram perfil bioquímico característico de *Salmonella* spp. – bastonetes Gram-negativos, catalase positivas e oxidase negativas – foram submetidas à identificação por meio do kit API 20E (BioMérieux). A caracterização bioquímica foi realizada seguindo as instruções do fabricante, e a identificação final obtida pelo *software* API LAB PLUS (BioMérieux).

Os isolados característicos do gênero foram preservados em criotubos contendo caldo BHI, acrescidos de glicerol 50%, e armazenados à temperatura de -20°C.

2.2.11 Isolamento de *Listeria monocytogenes*

A etapa de pré-enriquecimento consistiu na homogeneização de 25 g de cada amostra, pesadas assepticamente e adicionadas a 225 mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB). A amostra, acrescida do caldo LEB sem os agentes seletivos, foi homogeneizada durante 4 minutos em Stomacher[®] e incubada a 30°C por 4 horas. Em seguida, os agentes seletivos (soluções de acriflavina, ácido nalidíxico e cicloeximida) foram adicionados ao caldo, que foi

reincubado a 30°C por 44 horas. Após incubação, uma alçada foi estriada, por meio de estrias de esgotamento, na superfície do ágar palcam, acrescido do suplemento seletivo *Listeria*-palcam, contendo sulfato de polimixina B, ceftazidima e hidrocloreto de acriflavina, e as placas foram incubadas a 37°C por 24-48 horas.

Para purificação das colônias típicas – colônias acinzentadas a negras –, os isolados foram estriados em ágar tripticase de soja (TSA) suplementado com 0,6% de extrato de levedura e incubados a 37°C por 24 horas. A triagem bioquímica foi realizada por meio dos testes de coloração diferencial de Gram, catalase e motilidade.

2.2.12 Isolamento de *Campylobacter* spp.

Para o isolamento de *Campylobacter* spp., a etapa de enriquecimento consistiu na homogeneização de 25 g da amostra em 225 mL de caldo Bolton, acrescido de sangue de cavalo e do suplemento seletivo Bolton, contendo os antibióticos cefoperazona, vancomicina, trimetoprim e anfotericina. A amostra homogeneizada foi incubada em atmosfera microaerófila a 37°C por 4 horas e transferida para 41,5°C por 44 horas. Após o período de incubação do caldo de enriquecimento, uma alçada foi estriada, por meio de estrias de esgotamento, em ágar charcoal cefoperazona desoxicolato modificado e em ágar Skirrow, ambos acrescidos de sangue de cavalo e do suplemento seletivo para *Campylobacter*. As placas foram incubadas a 41,5°C por 48 horas, em atmosfera microaerófila e, após o período de incubação, foi observado o desenvolvimento de colônias típicas de *Campylobacter* – colônias acinzentadas, geralmente com brilho metálico, planas e úmidas. As colônias características foram estriadas em ágar columbia sangue, para purificação, sendo as placas incubadas a 41,5°C por 24-48 horas, em atmosfera microaerófila.

Para a triagem bioquímica, os isolados foram submetidos aos testes de coloração diferencial de Gram, catalase, morfologia e motilidade, oxidase e teste de crescimento a 41,5°C em atmosfera aeróbica.

2.3 Caracterização genotípica

A partir de testes bioquímicos prévios e identificação por meio do API 20E, 27 isolados, compreendendo estirpes de *E. coli* (21 cepas) e *Salmonella* spp. (6 cepas), foram selecionados para as análises moleculares.

O DNA dos isolados foi extraído utilizando-se o kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Germany), e a extração do DNA realizada conforme as instruções do fabricante. Para análise de PCR, a reação foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 37,1 µL de água Milli-Q estéril, 5 µL de tampão Master Mix 10X, 0,4 µL de dNTPs, 1 µL de cada primer (27f / 1512r), 0,5 µL de Taq DNA polimerase, 3 µL de MgCl₂ e 2 µL de DNA.

A região 16S do rDNA foi amplificada por meio dos *primers* universais para procaríotos 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1512r (5'-CGGCTACCTTGTTACGACT-3') utilizando-se a metodologia descrita por Wang et al. (2006). A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C, por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C, por 1 minuto, 52°C, por 45 segundos, e 72°C, por 1 minuto. Uma extensão final a 72°C foi realizada por 7 minutos. Os produtos amplificados foram sequenciados pela Macrogen (Coreia do Sul), e as sequências obtidas comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados do GenBank, empregando-se a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.4 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH) e da atividade de água (a_w) das amostras

Para a avaliação dos parâmetros intrínsecos das amostras de linguiça suína frescal, o pH foi aferido com o auxílio do pHmetro PHS-3B (Labmeter modelo PH2), no Laboratório de Fermentações, no Departamento de Biologia, e a a_w mensurada utilizando-se o aparelho Aqualab, fabricante Braseq, no Laboratório de Cereais, no Departamento de Ciência dos Alimentos, ambos localizados na Universidade Federal de Lavras.

2.5 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Foram selecionados 32 isolados, previamente identificados, compreendendo 21 cepas de *E. coli*, 6 cepas de *Salmonella* spp. e 5 cepas de *Staphylococcus* sp., para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos pelo método disco-difusão em ágar, segundo recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

Os isolados foram reativados em caldo BHI a 37°C por 24 horas e o inóculo padronizado com densidade celular correspondente a 10^8 UFC/mL, por curva de crescimento.

Foi realizado um esfregaço com auxílio de suabe estéril na superfície do ágar Müller Hinton e, em seguida, adicionados os discos contendo os seguintes antimicrobianos (Polisensidisc DME[®]) para as estirpes Gram-negativas (*E. coli* e *Salmonella* spp.): amicacina, ampicilina, aztreonam, cefalotina, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cloranfenicol, gentamicina, sulfazotrim e tetraciclina. Para as estirpes Gram-positivas (*Staphylococcus* sp.), os antimicrobianos utilizados foram: aztreonam, cefoxitina, ceftriaxona, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, oxacilina, penicilina G,

teicoplanina e tetraciclina. As placas foram, então, incubadas a 37°C por 24 horas e, após esse período, procedeu-se a mensuração dos halos de inibição ao redor dos discos. Para a interpretação do teste, o perfil de multirresistência foi calculado pelo índice MAR (Multiple Antibiotic Resistance), que é obtido pelo número de antibióticos resistentes à bactéria dividido pelo número de antibióticos testados. As estirpes que apresentaram índice MAR igual ou acima de 0,5 foram consideradas como multirresistentes aos antibióticos testados.

2.6 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

Para o teste de determinação da concentração mínima inibitória, foram selecionados 21 isolados, compreendendo 13 cepas de *E. coli*, 3 cepas de *Salmonella* spp. e 5 cepas de *Staphylococcus* sp., previamente identificados e considerados como multirresistentes aos antibióticos testados. Os ácidos láctico e acético foram empregados em diferentes concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 M, pelo método disco-difusão em ágar TSA. As concentrações de ácido láctico corresponderam a percentuais de 3,75; 7,5; 11,25; 15; 18,75; 22,5; 26,25 e 30%. Para o ácido acético, as concentrações corresponderam a 2,85; 5,7; 8,55; 11,4; 14,25; 17,1; 19,95 e 22,8%.

As culturas de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp., isoladamente, foram reativadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas, sendo o inóculo padronizado com densidade celular de aproximadamente 10^8 UFC/mL, por curva de crescimento. Foi realizado um esfregaço com auxílio de suabe estéril na superfície do ágar TSA, e discos de papel de filtro de 6 mm umedecidos com 10 µL de cada ácido, em cada uma das concentrações, foram aplicados nas placas. Após incubação a 37°C por 24 horas, foi determinada a tolerância aos ácidos por meio da medição dos halos de inibição.

2.7 Determinação da concentração mínima bactericida

Estirpes de *E. coli* (13 cepas), *Salmonella* spp. (3 cepas) e *Staphylococcus* sp. (5 cepas), previamente identificadas e consideradas como multirresistentes aos antibióticos testados, foram submetidas, isoladamente, à determinação da concentração mínima bactericida frente a ácidos orgânicos por meio da densidade óptica.

De cada cultivo, transferiu-se uma alíquota de 50 µL, com densidade celular de aproximadamente 10⁸ UFC/mL, acrescida de 30 µL de caldo BHI e 20 µL de cada ácido testado (lático e acético) nas diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 M) para microplacas com 96 poços. Após incubação das microplacas a 37°C por 24 horas, a densidade óptica dos cultivos foi mensurada a 620 nm (Multiskan FC – ThermoScientific Uniscience) com padronização para 0 em meio BHI sem cultivo acrescido de cada ácido nas concentrações testadas. Após a leitura, a viabilidade das estirpes foi conferida por plaqueamento em ágar EMB, ágar Rambach e ágar Baird-Parker, para as estirpes de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp., respectivamente.

2.8 Inibição de bactérias por ácido lático em linguiça suína frescal

Linguiças suína frescal foram elaboradas para avaliar a eficiência do ácido orgânico na inibição de *E. coli* (8 cepas), *Salmonella* spp. (2 cepas) e *Staphylococcus* sp. (3 cepas), sendo as estirpes inoculadas em combinação na linguiça. O ácido, as concentrações do mesmo e as estirpes selecionadas para o teste foram definidos após determinação da concentração mínima bactericida, sendo que o ácido lático apresentou maior inibição das estirpes; as concentrações utilizadas foram de 1,5 e 4,0 M (concentrações média e máxima), e as cepas inoculadas na linguiça foram as que apresentaram maior resistência.

Os inóculos, com densidade populacional de 10^8 UFC/mL, foram obtidos a partir das estirpes de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp. ressuspenso, isoladamente, em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas.

As linguiças foram elaboradas sob condições assépticas e sua formulação é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1 Formulação da linguiça suína frescal

Ingredientes	Quantidade
Cura Ibrac [®] (0,25%)	2,5 g
Fixamax C [®] (250 g/100 Kg)	2,5 g
Adifós [®] (250 g/100 Kg)	2,5 g
Max Sabor [®] (150 g/100 Kg)	1,5 g
Condimento Califórnia [®] (0,5%)	5 g
Sal refinado (1,5%)	15 g
Pernil suíno desossado	1000 g

Foram elaboradas linguiças com peso médio de 150 g (Figura 1) e, para os tratamentos acrescidos das bactérias e do ácido láctico, foram adicionados 3 mL de inóculo e 3 mL do ácido.



Figura 1 Linguiça suína frescal elaborada para avaliar a eficiência do ácido láctico na inibição de bactérias

As linguiças foram armazenadas em embalagens estéreis, estocadas em temperatura de 4°C e analisadas após 0, 5, 10 e 15 dias. Em cada tempo, 10 g de

cada amostra foram retiradas da parte interna da linguiça e adicionadas a 90 mL de água peptonada 1%, com homogeneização em Stomacher[®]. Diluições decimais seriadas foram preparadas, e o pH das linguiças foi aferido, conforme item 2.4. O plaqueamento foi realizado em ágar EMB, ágar Rambach e ágar Baird-Parker para contagem de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp., respectivamente.

2.9 Análise estatística

Para o teste de determinação da concentração mínima inibitória, utilizou-se o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC), com 3 repetições. Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x8x13 para *E. coli*, 2x8x3 para *Salmonella* spp. e 2x8x5 para *Staphylococcus* sp., sendo 2 ácidos testados (lático e acético) em 8 molaridades e o último fator do tratamento correspondente ao número de cepas testadas.

Para o teste de determinação da concentração mínima bactericida, utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 3 repetições, sendo utilizado o mesmo esquema fatorial do teste de determinação da concentração mínima inibitória.

O efeito da inibição de bactérias por ácidos orgânicos em linguiça suína frescal foi avaliado por meio do Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 3 repetições.

Os testes de determinação da concentração mínima inibitória e da concentração mínima bactericida foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott, considerando $p < 0,05$. Os dados quantitativos foram submetidos à análise de regressão, o mesmo acontecendo com o teste da inibição de bactérias por ácidos orgânicos. As

análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SISVAR[®] versão 4.5 (Lavras, Brasil) e o *software* R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da qualidade microbiológica de linguiças suína frescal

Os resultados das contagens bacterianas e os valores de pH e de a_w das amostras de linguiça suína frescal analisadas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Contagem presuntiva de bactérias aeróbias mesófilas (BAM), enterobactérias, *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* spp., em UFC/g, e resultados do pH e da a_w das amostras de linguiça suína fresca analisadas

Amostras	BAM	Enterobactérias	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> spp.	pH	a_w
L 1	$1,9 \times 10^9$	$8,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	5,62	0,965
L 2	$1,4 \times 10^9$	$5,8 \times 10^5$	$8,8 \times 10^3$	$6,9 \times 10^3$	5,62	0,970
L 3	$1,4 \times 10^9$	$5,0 \times 10^4$	$9,8 \times 10^3$	$9,3 \times 10^3$	5,75	0,960
L 4	$7,0 \times 10^6$	$1,9 \times 10^3$	$7,9 \times 10^3$	$8,1 \times 10^5$	5,74	0,973
L 5	$1,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$3,2 \times 10^5$	5,83	0,965
L 6	$1,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$6,1 \times 10^5$	5,64	0,967
L 7	$2,5 \times 10^5$	$6,3 \times 10^3$	< 10	$2,2 \times 10^4$	7,31	0,975
L 8	$1,5 \times 10^4$	< 10	$5,7 \times 10^3$	< 10	6,67	0,977
L 9	$5,2 \times 10^5$	< 10	< 10	$7,7 \times 10^3$	6,94	0,970
L 10	$4,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	< 10	$5,9 \times 10^3$	6,27	0,972
L 11	$1,1 \times 10^7$	$2,3 \times 10^3$	< 10	$3,1 \times 10^3$	5,40	0,979
L 12	$1,1 \times 10^6$	$6,7 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	6,41	0,961
L 13	$1,2 \times 10^4$	< 10	< 10	< 10	5,98	0,977
L 14	$1,1 \times 10^5$	$1,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	6,11	0,965
L 15	$6,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	5,72	0,976
L 16	$1,5 \times 10^7$	< 10	< 10	$6,5 \times 10^4$	6,08	0,980
L 17	$1,1 \times 10^6$	$4,1 \times 10^2$	< 10	$8,0 \times 10^4$	5,37	0,972
L 18	$6,6 \times 10^7$	$4,3 \times 10^2$	< 10	$7,7 \times 10^4$	6,09	0,970
L 19	$6,7 \times 10^3$	< 10	< 10	< 10	5,93	0,987
L 20	$7,4 \times 10^3$	$6,3 \times 10^3$	< 10	< 10	5,76	0,974

A contagem de aeróbios mesófilos foi observada em todas as amostras de linguiça analisadas, com valores entre $6,7 \times 10^3$ e $1,9 \times 10^9$ UFC/g. Os resultados do presente trabalho para aeróbios mesófilos superaram os encontrados por Comi et al. (2005), que relataram contagens entre 10^4 e 10^6 UFC/g em carnes utilizadas como matérias-primas para elaboração de embutidos fermentados, no nordeste da Itália. Valores similares ao estudo – 10^8 UFC/g – foram encontrados por Fontán et al. (2007a) ao analisarem mesófilos totais em 20 amostras de “androlla”, uma tradicional linguiça suína fermentada produzida na Espanha. Samelis et al. (1998) também relataram contagens semelhantes – 10^8 UFC/g – em amostras de um salame tradicional proveniente da Grécia, o mesmo sendo observado por Metaxopoulos, Samelis e Papadelli (2001) ao estudarem embutidos cárneos fermentados, também produzidos nesse país.

Valores obtidos neste trabalho para aeróbios mesófilos indicam falhas no processamento e na obtenção das amostras analisadas, uma vez que a contagem total de aeróbios mesófilos consiste no método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Ela não diferencia tipos de bactérias, sendo utilizada para se obter informações gerais sobre a qualidade dos produtos, práticas de manufatura, matérias-primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida útil do alimento. Embora possa ser útil na avaliação da qualidade, os microrganismos indicadores são mais comumente utilizados para avaliar a segurança e a higiene alimentar (FORSYTHE, 2002).

Em relação à contagem total de enterobactérias, 25% (5/20) das amostras – L8, L9, L13, L16 e L19 – não apresentaram contaminação. Nas demais amostras, a maior população encontrada correspondeu a $8,5 \times 10^5$ UFC/g. Em concordância com o estudo, Fontán et al. (2007a), ao analisarem 20 amostras de linguiça fermentada espanhola, relataram desde a ausência até a contagem máxima em torno de 10^4 UFC/g. Fontán et al. (2007b) também relataram valores similares aos do presente estudo – 10^4 UFC/g – ao avaliarem

15 amostras de “Botillo”, uma tradicional linguiça fermentada produzida no noroeste da Espanha.

Na análise qualitativa (presença/ausência) para *Salmonella* spp., foram selecionados 100 isolados. Após triagem bioquímica (testes em LIA e TSI, coloração diferencial de Gram, oxidase e catalase), 6 isolados foram identificados como *Salmonella* spp. com perfil de similaridade de 99,9% no kit API 20E. As 6 estirpes – isoladas das amostras L10, L11, L12, L18 e L20 – foram submetidas à identificação molecular, sendo todas confirmadas como *Salmonella* e 3 espécies foram encontradas: *S. Typhi*, *S. Typhimurium* e *S. Paratyphi*. O resultado da análise demonstrou que 25% das amostras de linguiça estavam contaminadas pela bactéria.

De acordo com a legislação vigente para embutidos frescos, o gênero *Salmonella* deve estar ausente em 25 g da amostra (BRASIL, 2001). Os resultados do presente estudo não se encontram em conformidade com a legislação, uma vez que foi confirmada a presença da bactéria em 5 das 20 amostras analisadas. Conforme Berends et al. (1996), a carne suína é uma importante fonte de *Salmonella*, o que pode ser confirmado neste estudo, no qual 25% das amostras de linguiça suína analisadas foram positivas para a bactéria.

Os resultados do presente estudo superaram valores relatados por alguns autores. Spricigo et al. (2008), ao analisarem amostras de linguiça suína tipo frescal, disponíveis no comércio de Lages/SC, detectaram que 12,8% das amostras estavam contaminadas por *Salmonella* spp. Em trabalho realizado por Prendergast et al. (2009), amostras de carne suína foram coletadas aleatoriamente em açougues e supermercados na República da Irlanda, entre janeiro e novembro de 2007, e a bactéria *Salmonella* spp. foi detectada em 2,6% das amostras analisadas. A presença de *Salmonella* spp. foi detectada, também, por Boughton et al. (2004), em 2,3% das amostras de carne suína avaliadas no período de 2001 a 2002, na Irlanda. Além desses autores, Jordan et al. (2006)

relataram a presença de *Salmonella* spp. em amostras de carne de porco crua, procedentes da República da Irlanda, coletadas em três períodos distintos (anos de 2002, 2003 e 2004), com prevalência correspondente a 2,3%, 2,0% e 2,1%, respectivamente.

Um total de 65% (13/20) das linguiças suína frescal analisadas – L1, L2, L3, L6, L7, L10, L11, L12, L14, L15, L17, L18 e L20 – foram positivas para coliformes termotolerantes. No entanto, todas apresentaram enumeração de 10^1 a 10^2 NMP/g, abaixo do preconizado pela legislação brasileira – 10^3 NMP/g – como limite máximo aceitável (BRASIL, 2001). Resultados divergentes foram encontrados por Barbosa et al. (2003), que avaliaram 22 amostras de linguiça suína frescal no município de Sete Lagoas/MG e constataram que 68% das amostras apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira.

Os resultados do presente estudo também não se encontram em conformidade com os relatados por Marques et al. (2006) e Chaves et al. (2000). Marques et al. (2006), ao analisarem 40 amostras de linguiça frescal, comercializadas em nos municípios mineiros de Lavras e Três Corações, encontraram 35% das amostras fora do padrão legal vigente para coliformes termotolerantes. Em adição, Chaves et al. (2000) verificaram que 33% das amostras de linguiça frescal de carne suína comercializadas no Rio de Janeiro/RJ apresentaram níveis de coliformes termotolerantes até dez vezes superiores ao preconizado pela legislação brasileira.

Para caracterização bioquímica de *E. coli* foram selecionados 70 isolados. Após triagem por meio dos testes de coloração diferencial de Gram, catalase, oxidase e IMViC, 26 isolados foram característicos da espécie. Desses 26 isolados, 21 foram identificados como *E. coli* com perfil de similaridade de 99,9% no kit API 20E. As 21 estirpes foram, então, submetidas à identificação molecular, sendo confirmadas 16 cepas – isoladas das amostras de linguiça L1,

L2, L3, L12, L14, L15, L17 e L20. O resultado da análise demonstrou que 40% das amostras de linguiça estavam contaminadas por *E. coli*.

Dados inferiores aos encontrados neste estudo foram relatados por alguns autores. Em trabalho realizado por Nastasijevic, Mitrovic e Buncic (2009), na Sérvia, foi investigada a ocorrência de *E. coli* O157 em amostras de carne moída e de massa destinada à produção de linguiça fermentada. O resultado apontou contaminação para a bactéria em 6,2% e 2,1% das amostras, respectivamente. Em estudo semelhante, Abong'o e Momba (2009), investigaram a prevalência de *E. coli* O157:H7 em 180 amostras de carnes e produtos cárneos no Distrito de Amathole, África do Sul, detectando a prevalência da bactéria em 2,8% das amostras analisadas, indicando, direta ou indiretamente, contaminação das amostras por matéria de origem fecal e falhas no processamento e manipulação, uma vez que *E. coli* é a espécie que apresenta, como fonte primária, o trato gastrointestinal (BRASIL, 2001).

Em relação à contagem presuntiva de *Staphylococcus* sp., a maior população encontrada foi correspondente a $1,6 \times 10^4$ UFC/g. Foram, então, selecionados 90 isolados para a caracterização bioquímica (testes de coloração diferencial de Gram, catalase e coagulase). Não foram encontrados isolados coagulase positiva, sendo selecionados 5 isolados caracterizados como coagulase negativa para identificação no kit API Staph. As 5 cepas foram identificadas com perfil de similaridade de 99,9%, e os resultados demonstraram a presença das espécies *Staphylococcus xylosus* (para 4 isolados) e *Staphylococcus epidermidis* (para 1 isolado). As espécies confirmadas – isoladas das amostras de linguiça L4, L5 e L14 – demonstraram que 15% das amostras de linguiça analisadas estavam contaminadas pela bactéria.

Em concordância com o estudo, Morot-Bizot, Leroy e Talon (2006) relataram a presença de 412 cepas do gênero *Staphylococcus* isoladas de

produtos cárneos provenientes de uma pequena unidade de fabricação na França, com contagens variando de 1×10^3 a 3×10^5 UFC/g.

Dados similares ao estudo foram encontrados por Pelisser et al. (2009), que analisaram 18 amostras de linguiça colonial, coletadas na região do Alto Uruguai Catarinense/SC. A partir das amostras, 84 cepas de *Staphylococcus* spp. foram isoladas, das quais 20% foram identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa.

Em trabalho realizado por Stamford et al. (2006), foram isoladas 109 cepas de *Staphylococcus* spp. de leite *in natura*, sendo 29,35% das cepas identificadas como *Staphylococcus* coagulase negativa.

Embora a produção de enterotoxinas esteja, geralmente, associada à *S. aureus* coagulase e termonuclease positivos, algumas espécies que não produzem essas enzimas também podem produzir enterotoxinas (JAY, 2005). De acordo com Pereira, Carmo e Pereira (2001), espécies coagulase negativas, como as detectadas neste trabalho, são capazes de produzir toxinas e foram evidenciadas em estudos, acarretando riscos para a saúde pública.

Considerando a contagem presuntiva para *Streptococcus* spp., o gênero foi encontrado em 80% (16/20) das linguiças analisadas, sendo a maior população correspondente a $8,1 \times 10^5$ UFC/g.

As 20 amostras analisadas neste estudo não apresentaram contaminação por *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* e *Campylobacter* spp.

Discordando dos dados encontrados neste trabalho, Comi et al. (2005), ao analisarem a carne utilizada para a produção de embutidos fermentados naturais, no nordeste da Itália, confirmaram a presença de *Pseudomonas* spp. nas amostras, embora em nível reduzido – 10^3 UFC/g.

Também em contraste com o presente estudo, Silva et al. (2004), detectaram *Listeria* spp. em 100% das 41 amostras de linguiça provenientes de

frigoríficos do município de Pelotas/RS. Dentre as diferentes espécies encontradas, *L. monocytogenes* foi isolada em 29,3% das amostras. Em trabalho de Maneru e Garcia-Jalón (1995), realizado na Espanha, os autores encontraram *L. monocytogenes* em 19,5% e 29,3% das amostras de carne bovina e suína analisadas, respectivamente, e Dediol et al. (2002) relataram a presença da bactéria em 37% das amostras de carne bovina obtidas em supermercados e açougues na região de Mendoza, Argentina.

Little et al. (2008) estudaram a prevalência de *Campylobacter* e *Salmonella* em 3959 amostras de carnes do Reino Unido, no período 2003-2005. O resultado demonstrou que a incidência do gênero *Salmonella* e *Campylobacter* foi de 2,4% e 7,2%, respectivamente. Dentre os diferentes tipos de carne analisadas, a contaminação em carne suína por *Campylobacter* foi de 6,3%, seguida de 3,9% das amostras contaminadas por *Salmonella*. Em relação ao gênero *Campylobacter*, os dados do presente estudo são contraditórios quando comparados à pesquisa realizada por esses autores, uma vez que não foi detectada a presença dessa bactéria nas amostras de linguiça analisadas. A ausência de *Campylobacter* neste estudo pode ser explicada pela temperatura mínima de crescimento dessas bactérias, sendo relatado o crescimento apenas em temperaturas superiores às utilizadas no armazenamento de linguiças (STANLEY; JONES, 2003).

Em pesquisa conduzida por Ferreira et al. (2007), foram avaliados 38 lotes de linguiça tradicional portuguesa provenientes de 17 produtores. Foi constatada a ausência de *Campylobacter* spp. e *E. coli* O157 em todas as amostras, e *C. perfringens*, quando presentes, não estavam em níveis preocupantes em relação à saúde pública, uma vez que a maior população encontrada foi de 10^3 UFC/g. *Salmonella* spp. foi detectada em dois lotes da linguiça, e mais de 60% dos lotes analisados estavam contaminados com *Listeria monocytogenes*. Os resultados desses autores são similares aos do presente

estudo para *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. No entanto, para *Listeria monocytogenes* os dados são divergentes aos encontrados neste estudo.

Os valores do pH das amostras variaram entre 5,37 e 7,31. Inferências sobre a influência do potencial hidrogeniônico das amostras de linguiça sobre o crescimento não podem ser feitas uma vez que, nesta faixa de pH, está situado o ótimo de crescimento das bactérias identificadas.

Em relação à atividade de água das linguiças, a média dos valores foi de 0,972, sendo os valores encontrados situados na faixa ideal para a multiplicação dos microrganismos identificados.

As estirpes de *E. coli* e *Salmonella* spp., confirmadas pelos testes bioquímicos e pelo kit API 20E, foram identificadas por meio do sequenciamento da região 16S do rDNA e são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 Bactérias isoladas de linguiças suína frescal e identificadas por sequenciamento da região 16S do rDNA

Isolados	Microrganismo identificado	Porcentagem de similaridade	Número de acesso no Gene Bank
UFLA EC 4	<i>Escherichia coli</i>	99%	GU594316.1
UFLA EC 5	<i>Escherichia coli</i>	98%	EF560787.1
UFLA EC 7	<i>Escherichia coli</i>	99%	EF560787.1
UFLA EC 12	<i>Escherichia coli</i>	99%	HQ738475.1
UFLA EC 13	<i>Escherichia coli</i>	99%	EF620924.1
UFLA EC 14	<i>Escherichia coli</i>	99%	EF560787.1
UFLA EC 15	<i>Escherichia coli</i>	99%	GU594316.1
UFLA EC 37	<i>Escherichia coli</i>	99%	EF620924.1
UFLA EC 38	<i>Escherichia coli</i>	98%	HQ738475.1
UFLA EC 44	<i>Escherichia coli</i>	99%	GU594309.1
UFLA EC 47	<i>Escherichia coli</i>	99%	HQ738475.1
UFLA EC 50	<i>Escherichia coli</i>	99%	EF560787.1
UFLA EC 53	<i>Escherichia coli</i>	98%	HQ738475.1
UFLA EC 66	<i>Escherichia coli</i>	99%	HQ738475.1
UFLA EC 67	<i>Escherichia coli</i>	98%	EF560787.1
UFLA EC 69	<i>Escherichia coli</i>	98%	HQ738475.1
UFLA SALM 46	<i>Salmonella</i> Typhimurium	99%	CP002614.1
UFLA SALM 52	<i>Salmonella</i> Typhimurium	99%	CP002614.1
UFLA SALM 55	<i>Salmonella</i> Typhimurium	98%	U90316.1
UFLA SALM 57	<i>Salmonella</i> Typhi	99%	DQ480723.1
UFLA SALM 86	<i>Salmonella</i> Paratyphi	98%	CP000857.1
UFLA SALM 100	<i>Salmonella</i> Typhi	98%	DQ480723.1

Para as estirpes UFLA EC 3, 6, 10, 41 e 68 não foi encontrada similaridade significativa

3.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos

No teste de sensibilidade a antimicrobianos, foram testadas estipes de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp. Os índices de múltipla resistência a antibióticos para as bactérias analisadas são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 Índice de múltipla resistência (índice MAR) a antibióticos de bactérias isoladas de linguiça suína frescal

Microrganismos	Nº de isolados	Índice MAR							
		0,33	0,42	0,5	0,58	0,67	0,75	0,83	
<i>E. coli</i>	21	2	2	4	4	7	0	1	1
<i>Salmonella</i> spp.	6	1	0	2	0	1	1	1	0
<i>Staphylococcus</i> sp.	5	0	0	0	0	2	0	2	1

Em relação à *E. coli*, 61,9% das cepas apresentaram índice MAR igual ou superior a 0,5, sendo o maior índice correspondente a 0,83. Dentre as cepas de *Salmonella* spp., 50% exibiram índice MAR igual ou maior que 0,5, sendo o maior índice de 0,75. Já em relação às estirpes de *Staphylococcus* sp., o índice MAR mostrou-se igual ou maior que 0,58, sendo todas avaliadas como multirresistentes.

A susceptibilidade aos antimicrobianos de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp. é mostrada nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 Susceptibilidade antimicrobiana de *E. coli* (21 cepas) e de *Salmonella* spp. (6 cepas) isoladas de linguiças suína frescal

Antimicrobianos	Concentração dos discos (μg)	Número de isolados					
		<i>E. coli</i>			<i>Salmonella</i> spp.		
		R	I	S	R	I	S
Amicacina	30	17	4	0	6	0	0
Ampicilina	10	13	6	2	5	1	0
Aztreonam	30	3	8	10	1	4	1
Cefalotina	30	20	1	0	5	1	0
Cefotaxima	30	11	6	4	4	2	0
Cefoxitina	30	5	3	13	4	0	2
Ceftazidima	30	8	8	5	2	3	1
Ceftriaxona	30	2	6	13	1	2	3
Cloranfenicol	30	8	5	8	2	1	3
Gentamicina	10	20	1	0	5	0	1
Sulfazotrim	25	8	0	13	1	0	5
Tetraciclina	30	11	2	8	1	1	4

R, resistente; I, intermediário; S, sensível

Tabela 6 Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* sp. (5 cepas) isoladas de linguiças suína frescal

Antimicrobianos	Concentração dos discos (μg)	Número de isolados		
		<i>Staphylococcus</i> sp.		
		R	I	S
Aztreonam	30	5	0	0
Cefoxitina	30	4	0	1
Ceftriaxona	30	4	1	0
Clindamicina	2	2	1	2
Cloranfenicol	30	5	0	0
Eritromicina	15	2	3	0
Gentamicina	10	2	1	2
Oxacilina	1	4	1	0
Penicilina G	10	5	0	0
Teicoplamina	30	4	0	1
Tetraciclina	30	5	0	0

R, resistente; I, intermediário; S, sensível

Segundo Bogaard e Stobberingh (2000), é favorável a utilização de *E. coli* como bactéria indicadora de resistência a antimicrobianos, uma vez que qualquer alteração no perfil de resistência dessa estirpe serve como alerta para a resistência de outras bactérias patogênicas de origem entérica que, normalmente, são veiculadas em alimentos de origem animal. Alimentos elaborados com carne suína são apontados dentre os de maior risco a *E. coli* MAR, sendo a resistência de *E. coli* a antimicrobianos mais prevalente em suínos que bovinos (LIM et al., 2007; SAYAH et al., 2005).

Em trabalho realizado por Enne et al. (2008), na Grã-Bretanha, de um total de 2480 cepas de *E. coli* isoladas de suínos em abate, 92% foram resistentes a, pelo menos, 1 antimicrobiano, e 62,8% foram resistentes a 3 ou mais antimicrobianos, independente das classes usadas na medicina humana. Esses dados são similares aos encontrados neste estudo, no qual 100% (21/21) das cepas de *E. coli* foram resistentes a, pelo menos, 3 antimicrobianos testados.

Magwira, Gashe e Collison (2005) relataram que cerca de 35% das cepas *E. coli* O157:H7 isoladas de carnes e produtos cárneos, em Gaborone, Botswana, foram resistentes a cefalotina, sulfato de colistina, sulfatriad e tetraciclina. Em trabalho posterior, Abong'o e Momba (2009) constataram que estirpes de *E. coli* O157:H7, isoladas de 180 amostras de carnes e produtos cárneos no Distrito de Amathole, África do Sul, foram resistentes a 5 dos 8 antibióticos testados: gentamicina, ampicilina, ácido nalidíxico, eritromicina e tetraciclina. No presente estudo, resultado similar foi encontrado para cefalotina e gentamicina, no qual 95,24% (21/20) das cepas de *E. coli* foram resistentes a esses antimicrobianos. Para ampicilina, 61,9% (13/21) apresentaram resistência ao antimicrobiano. Já em relação à tetraciclina, a porcentagem de cepas resistentes ao antibiótico correspondeu a 52,38% (11/21).

Em estudo conduzido por Zhao et al. (2007), ao analisarem 380 cepas de *Salmonella* isoladas de animais doentes, incluindo suínos, bovinos, perus,

galinhas e cavalos, os autores constataram que 82% das estirpes foram resistentes a, pelo menos, 1 antimicrobiano, e 70% foram resistentes a 3 ou mais antibióticos. Esses dados são similares aos encontrados neste estudo, no qual 100% (6/6) das cepas de *Salmonella* spp. foram resistentes a, pelo menos, 3 antimicrobianos testados.

Davis et al.(2007) relataram que cepas de *Salmonella* Dublin isoladas de 19 amostras de carne bovina foram resistentes a, pelo menos, 1 antimicrobiano testado. Dados superiores foram encontrados neste trabalho, no qual 100% das cepas de *Salmonella* spp. apresentaram resistência a, pelo menos, 3 antibióticos.

Em relação à *Staphylococcus* sp., 100% das estirpes testadas foram resistentes a 4 dos 11 antibacterianos testados: penicilina G, tetraciclina, cloranfenicol e aztreonam. Esses resultados estão em concordância com Rapini et al. (2004), que relataram resistência à penicilina G e tetraciclina em 100% das 45 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho comercializado em praias do nordeste brasileiro. Os resultados do presente estudo assemelham-se, também, aos descritos por Faria (1999) e superam os relatados por Adesiyun, Webb e Romain (1998) e Oliveira et al. (1999), que estudaram a resistência antimicrobiana para cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite cru.

De acordo com Ghosh e Lapara (2007) e Hammerum e Heuer (2009), bactérias provenientes de alimentos de origem animal apresentam, frequentemente, resistência a uma gama de agentes antimicrobianos comumente utilizados em seres humanos, sendo possível que esses organismos resistentes sejam transferidos para o homem, quer seja por meio da cadeia alimentar ou indiretamente pela propagação de resíduos animais nos campos.

A presença de bactérias resistentes em alimentos de origem animal, como a linguiça, pode possibilitar a troca de elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons codificadores de resistência a antimicrobianos, facilitando a rápida disseminação entre as bactérias

(ALEKSHUN; LEVY, 1999; SLAMA et al., 2010). Dessa forma, estirpes que apresentam perfil de multirresistência a antibióticos constituem-se em grave problema para a saúde coletiva, uma vez que acarretam menor escolha no uso de medicamentos para o tratamento de doenças em humanos.

3.3 Determinação da concentração mínima inibitória

Os resultados do teste de determinação da concentração mínima inibitória para avaliar a susceptibilidade bacteriana aos ácidos láctico e acético são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 Efeito de diferentes fatores e suas interações sobre o halo de crescimento

	Nível de Significância		
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
E	***	**	***
A	***	***	***
C	***	***	***
E x A	***	**	***
E x C	NS	NS	NS
A x C	***	***	***
E x A x C	NS	NS	NS

E, estirpe; A, ácido; C, concentração; NS, não significativo; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. As interações estatisticamente significativas estão marcadas em negrito

Observou-se maior média dos halos de inibição para *E. coli* e *Salmonella* spp. no tratamento com ácido acético, sendo os maiores halos observados nas estirpes UFLA EC 5, 14, 37, 38, 41, 47 e 68 e UFLA SALM 52. O ácido láctico não apresentou interação significativa para *Salmonella* spp. Com relação aos isolados de *Staphylococcus* sp., o ácido láctico foi mais eficaz no

tratamento, apresentando maiores halos de inibição nas estirpes UFLA STAP 34, 37 e 69 (Tabelas 1A, 1B e 1C, APÊNDICE).

As concentrações dos ácidos acético e lático para *E. coli* não diferiram estatisticamente. Para *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp., os ácidos acético e lático, respectivamente, apresentaram diferença significativa a partir da concentração de 1,5 Molar (Tabelas 1D, 1E e 1F, APÊNDICE).

3.4 Determinação da concentração mínima bactericida

Os resultados do teste de determinação da concentração mínima bactericida são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 Efeito de diferentes fatores e suas interações sobre a absorvância

	Nível de Significância		
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
E	***	***	***
A	***	***	***
C	***	***	***
E x A	***	***	***
E x C	***	NS	***
A x C	***	**	**

E, estirpe; A, ácido; C, concentração; NS, não significativo; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. As interações estatisticamente significativas estão marcadas em negrito

Para os isolados de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp., observou-se menor leitura da absorvância para as culturas tratadas com ácido lático, sendo o mesmo considerado mais eficaz na redução da população das bactérias. As estirpes UFLA EC 5, 37 e 67, UFLA SALM 46, 52 e 57 e UFLA STAP 69 exibiram os menores valores de absorvância quando tratadas com o ácido lático (Tabelas 1G, 1H e 1I, APÊNDICE).

Os ácidos foram mais eficazes nas seguintes concentrações para determinadas estirpes de *E. coli*: 0,5 e 1,5 M – estirpes UFLA EC 14 e 67; 1 M – estirpes UFLA EC 14, 67 e 69; 2 M – estirpes UFLA EC 14, 37 e 67; 2,5 M - estirpes UFLA EC 14, 37, 67 e 69; 3 e 3,5 M □ estirpes UFLA EC 5, 14, 37, 67 e 69; e 4 M – estirpes UFLA EC 67 e 69. Para *Staphylococcus* sp., a concentração 0,5 M foi mais eficiente na inibição da estirpe UFLA STAP 38. As demais concentrações (1,0 a 4,0 M) mostraram maior inibição na estirpe UFLA STAP 69. Tanto para as estirpes de *E. coli* quanto para as de *Staphylococcus* sp., os dados revelaram comportamento quadrático em função da molaridade (Tabelas 1J e 1K, APÊNDICE).

As concentrações de ácido láctico não diferiram estatisticamente para *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp. Tanto para o ácido láctico quanto para o ácido acético, os dados referentes às três bactérias distintas mostraram comportamento quadrático em função da concentração (Tabelas 1L, 1M, e 1N, APÊNDICE).

De maneira geral, no presente experimento, o ácido láctico foi mais eficaz na redução da população das três bactérias analisadas. No entanto, as concentrações não diferiram estatisticamente.

O ácido acético, por apresentar constante de acidez (pK_a) correspondente a 4,75, ou seja, mais próximo ao pH do meio (6,5), deveria ser o mais eficaz no presente estudo, pois segundo Hsiao e Siebert (1999), o pK_a próximo ao pH contribui para maior quantidade relativa de ácido não dissociado, estado em que o ácido orgânico atravessa a membrana plasmática. No entanto, o ácido láctico, que possui pK_a correspondente a 3,86, apresentou maior inibição das bactérias. Isso pode ser atribuído ao maior teor de acidez, uma vez que, no interior da célula, ao dissociar-se, o ácido láctico decresce o valor de pH mais rápido, pois quanto menor o pK_a de um ácido maior a sua acidez. Em adição, Nazer et al. (2005) e Aslim et al. (2005) afirmaram que o estado não dissociado da molécula

é mais prevalente em pH baixo, elucidando, assim, a maior eficiência do ácido láctico frente às bactérias neste trabalho.

3.5 Inibição de bactérias por ácido láctico em linguiça suína fresca

De acordo com os resultados obtidos no teste de determinação da concentração mínima bactericida, as concentrações de 1,5 M e 4,0 M representaram as concentrações média e máxima testadas dos dois ácidos, sendo selecionado o ácido láctico para este experimento em função da sua maior inibição frente às estirpes avaliadas.

Não houve detecção das bactérias testadas na carne e no envoltório utilizado na fabricação das linguiças utilizadas no experimento.

A Figura 2 mostra o resultado observado para o controle positivo e a concentração de 1,5 M para o ácido láctico, considerando a leitura do plaqueamento em ágar EMB, meio seletivo para *E. coli*.

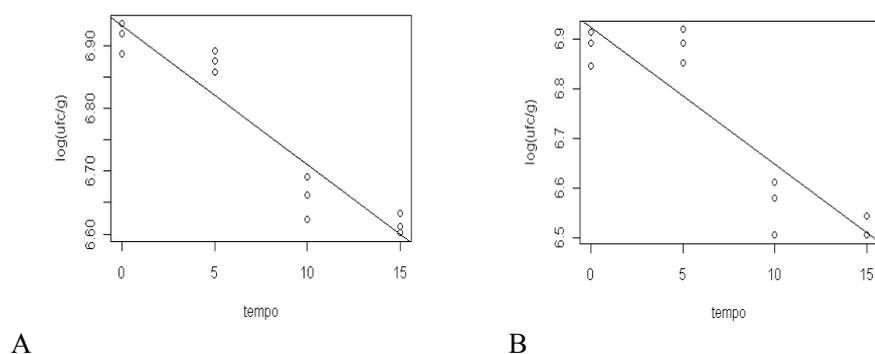


Figura 2 Variação das médias das contagens de *E. coli* (Log UFC/g) em linguiças suína, acrescidas de ácido láctico na concentração 1,5 M (A) e em relação ao controle positivo (B) em função do tempo de estocagem

Não foi observada redução significativa na contagem de *E. coli* (< 1 ciclo log), em relação ao controle, na linguiça frescal acrescida de ácido láctico na concentração final de 1,5 M.

A Figura 3 mostra o resultado observado para o controle positivo e a concentração de 4,0 M para o ácido láctico, considerando a leitura do plaqueamento em ágar EMB, meio seletivo para *E. coli*.

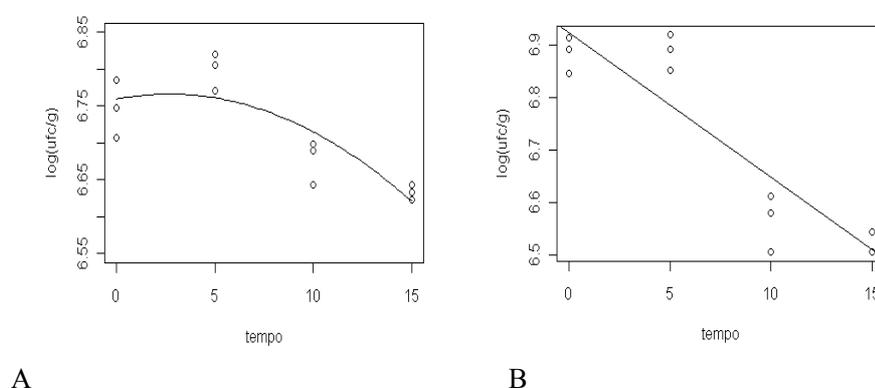


Figura 3 Variação das médias das contagens de *E. coli* (Log UFC/g) em linguiças suína, acrescidas de ácido láctico na concentração 4,0 M (A) e em relação ao controle positivo (B) em função do tempo de estocagem

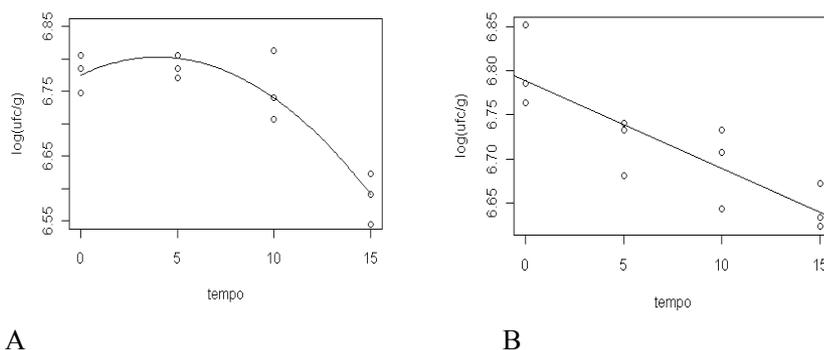
As linguiças inoculadas com as bactérias e adicionadas de ácido láctico na concentração 4 M apresentaram um pequeno aumento da população de *E. coli*, observado até, aproximadamente, o 3º dia de armazenamento, sendo encontrado nesse tempo o valor máximo de UFC/g.

Ao analisar os resultados para *E. coli*, no decorrer dos quatro tempos de armazenamento das linguiças suína frescal, observou-se que o ácido láctico, nas concentrações de 1,5 ou 4,0 M não foi eficaz na redução da população dessa bactéria quando comparado ao controle positivo. Apesar de observada uma

redução na população em função dos tempos de estocagem, as populações não reduziram significativamente quando tratadas com o ácido.

Gill (1986) e Nychas et al. (2008) afirmaram ser bem estabelecido que a glicose, o ácido lático e certos aminoácidos seguidos de nucleotídeos e proteínas solúveis em água são metabolizados por quase todas as bactérias da microbiota da carne. Tal fato pode ser relacionado ao presente estudo, no qual as concentrações de ácido lático avaliadas não reduziram significativamente a população de *E. coli* nas linguiças.

A Figura 4 mostra o resultado observado para o controle positivo e a concentração 1,5 M para o ácido lático, considerando a leitura do plaqueamento em ágar Rambach, meio seletivo para *Salmonella*.



A

B

Figura 4 Variação das médias das contagens de *Salmonella* spp. (Log UFC/g) em linguiças suína, acrescidas de ácido lático na concentração 1,5 M (A) e em relação ao controle positivo (B) em função do tempo de estocagem

Foi observado pequeno aumento na população de *Salmonella* spp. até o 4º dia de armazenamento, quando foi constatado o valor máximo de contagem.

A Figura 5 mostra o resultado observado para o controle positivo e a concentração de 4,0 M para o ácido lático, considerando o resultado do plaqueamento em ágar Rambach, meio seletivo para *Salmonella*.

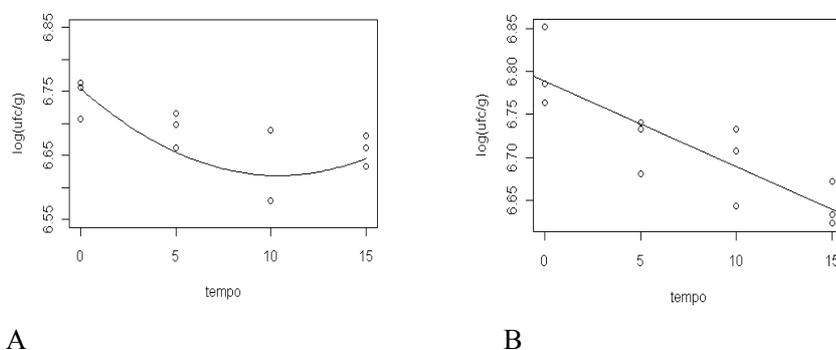


Figura 5 Variação das médias das contagens de *Salmonella* spp. (Log UFC/g) em linguiças suína, acrescidas de ácido láctico na concentração 4,0 M (A) e em relação ao controle positivo (B) em função do tempo de estocagem

Ainda para *Salmonella* spp., em linguiças inoculadas com as bactérias e acrescidas de ácido láctico na concentração 4 M, foi observada uma pequena redução da população da bactéria até, aproximadamente, o 11º dia de armazenamento, sendo encontrado, nesse tempo, o valor mínimo de UFC/g. A partir desse tempo, ocorreu um lento aumento na população da bactéria indicando provável resposta de tolerância ao ácido.

Entretanto, quando a adição do ácido nas duas concentrações foi comparada com o controle positivo, essa eficácia na inibição de *Salmonella* spp. não foi estatisticamente significativa, uma vez que não houve redução maior ou igual a 1 ciclo log.

As Figuras 6 e 7 mostram o resultado observado para o controle positivo e as concentrações de 1,5 e 4,0 M para o ácido láctico, considerando a leitura do plaqueamento em ágar Baird-Parker, meio seletivo para *Staphylococcus* sp.

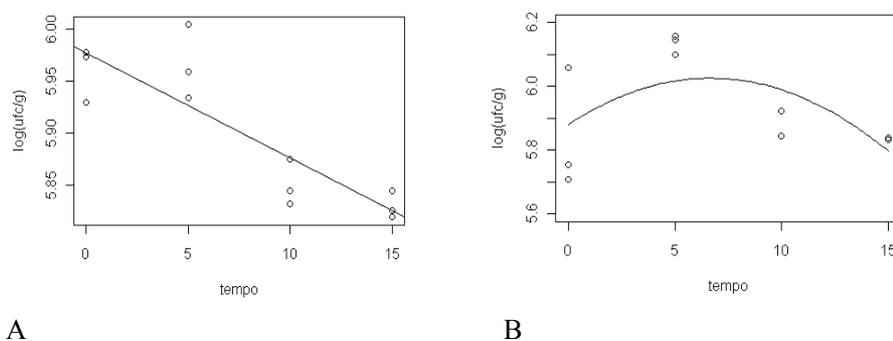


Figura 6 Variação das médias das contagens de *Staphylococcus* sp. (Log UFC/g) em linguiças suína, acrescidas de ácido láctico na concentração 1,5 M (A) e em relação ao controle positivo (B) em função do tempo de estocagem

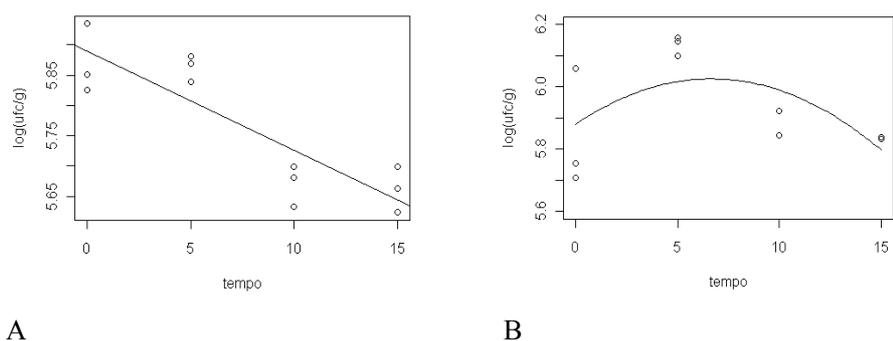


Figura 7 Variação das médias das contagens de *Staphylococcus* sp. (Log UFC/g) em linguiças suína, acrescidas de ácido láctico na concentração 4,0 M (A) e em relação ao controle positivo (B) em função do tempo de estocagem

Ao analisar os resultados para *Staphylococcus* sp., no decorrer dos quatro tempos de armazenamento das linguiças, observou-se que o ácido láctico, tanto na concentração 1,5 M quanto na concentração 4,0 M, apresentou pequena eficácia na redução da população do microrganismo. Apesar de observado um pequeno decréscimo na população da bactéria tratada com ácido láctico, o mesmo

não se mostra estatisticamente significativo, uma vez que não houve redução maior ou igual a 1 ciclo log.

Em relação ao pH das linguiças, acrescidas das bactérias e do ácido láctico nas concentrações de 1,5 e 4,0 M, os valores apresentaram redução a medida que se aumentava o tempo de estocagem (Tabela 9).

Tabela 9 pH das linguiças no decorrer do tempo de estocagem

Tratamentos	Período de armazenamento (dias)			
	0	5	10	15
Controle positivo	5,91	5,91	5,92	5,91
Inóculo + ácido láctico 1,5 M	5,43	5,23	5,18	5,10
Inóculo + ácido láctico 4 M	5,19	5,13	5,11	5,06

As linguiças elaboradas sem o ácido láctico, correspondentes ao controle positivo, exibiram maiores valores de pH quando comparadas às linguiças adicionadas com o ácido nas duas concentrações. Resultado esse já esperado, uma vez que a adição de ácidos no embutido acarretará uma diminuição no seu valor de pH.

De acordo com a Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o ácido láctico é permitido para uso em produtos frescos embutidos (BRASIL, 2006). No entanto, o limite máximo permitido para adição em embutidos não está estabelecido.

De maneira geral, os resultados observados para as estirpes *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp. inoculadas em combinação nas linguiças mostraram que não houve redução estatisticamente significativa na população das bactérias após tratamento com ácido láctico nas concentrações 1,5 e 4,0 M. Nessas concentrações, a contagem de microrganismos nas linguiças elaboradas com o ácido láctico foi similar ao controle positivo ao longo do tempo de

estocagem. De acordo com Barker e Park (2001), vários patógenos de origem alimentar apresentaram características de resistência contra vários tipos de ácidos orgânicos, embora essa sensibilidade varie de acordo com a natureza do acidulante utilizado.

Os ácidos orgânicos têm sido considerados como responsáveis pela quebra no metabolismo de aminoácidos, na síntese do DNA e no metabolismo energético dos microrganismos. Os ácidos diminuem o pH intracelular e podem causar alteração na permeabilidade da membrana, com o bloqueio do substrato e do sistema de transporte de elétrons. Os ácidos lipofílicos fracos, como láctico e acético, testados neste trabalho, apresentam a capacidade de atravessar a membrana celular de microrganismos em seu estado não dissociado e dissociam-se no interior da célula, produzindo íons H^+ e diminuindo, assim, o pH da célula. As células reagem eliminando os prótons para tentar manter o pH constante e esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior, reduzindo o crescimento celular microbiano (ADAMS, 1999; GREENACRE et al., 2003).

Segundo Del Río et al. (2007), Kanellos e Burriel (2005) e Mehyar et al. (2005), o uso de ácidos orgânicos deve ser considerado com certa cautela, por estes diminuírem o valor do pH da carne em função do tipo de ácido orgânico utilizado, do tempo de tratamento, da concentração do ácido e da associação com outras técnicas de descontaminação. Essas variáveis podem induzir uma resposta ácido-adaptativa, resultando em maior resistência às bactérias, fenômeno que tem sido denominado resposta de tolerância ao ácido, observado tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas (FOSTER; HALL, 1991; HILL; O'DRISCOLL; BOOTH, 1995; RICKE, 2003). No presente estudo, o fato de o ácido láctico apresentar resposta eficaz na inibição das bactérias, isoladamente, *in vitro* e não apresentar eficiência na inibição das bactérias inoculadas em combinação na linguiça pode ser explicado por essa resposta de tolerância ao ácido. O contato do ácido com as bactérias, por um

período de tempo mais longo, pode elucidar essa adaptação ao ácido, uma vez que as linguiças foram estocadas durante 15 dias em temperaturas de refrigeração. Já no teste *in vitro*, o contato das cepas com o ácido foi de, apenas, 24 horas.

Resposta de tolerância a ácido tem sido relatada em patógenos de origem alimentar, como *Escherichia coli* O157: H7 (BUCHANAN; EDELSON, 1999; GARREN; HARRISON; RUSSELL, 1997; LEENANON; DRAKE, 2001) e *Salmonella* spp. (BACON et al., 2003; BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998; FOSTER; HALL, 1990; GREENACRE et al., 2003; LEE; SLONCZEWSKI; FOSTER, 1994; LEYER; JOHNSON, 1992; YUK; SCHNEIDER, 2006), gêneros estes analisados no presente estudo.

Embora não se saiba como o alimento pode proteger as bactérias em condições extremamente ácidas, a presença de aminoácidos nos meios ácidos poderia desempenhar um papel significativo (LIN et al., 1995; WATERMAN; SMALL, 1996). Além disso, Waterman e Small (1998) verificaram que vários patógenos entéricos sensíveis a ácidos sobreviveram melhor em condições extremas de pH quando os microrganismos foram inoculados em carne moída ou ovo cozido, postulando que o teor de proteína dos alimentos pode proteger as bactérias contra os efeitos letais do fluido gástrico. Álvarez-Ordóñez et al. (2009) também relataram que o teor de proteína dos alimentos estaria relacionado com a sobrevivência de bactérias em ambientes extremamente ácidos. Esse efeito protetor estaria relacionado à existência de vários sistemas homeostáticos que utilizam aminoácidos extracelulares para adequar o pH intracelular bacteriano. Nesse aspecto, por exibirem alto teor de proteína, a carne e seus produtos, incluindo as linguiças, também se enquadrariam nessa condição.

Uma importante consequência dessa resposta bacteriana é o fato de que células adaptadas ao ácido podem ser mais resistentes ao ambiente fortemente

ácido encontrado no trato gastrintestinal, aumentando o risco de doenças humanas (KOO; MARSHALL; DE PAOLA, 2002). Em adição, Cheng, Yu e Chou (2003) afirmaram que os microrganismos ácido-adaptados podem tornar-se mais resistentes a condições estressantes e, ainda, mais infecciosos que os microrganismos não adaptados.

No caso específico de *Salmonella* spp., estudos realizados para esclarecer o efeito dos ácidos orgânicos na resposta de tolerância a ácido são escassos (GREENACRE et al, 2003; YUK; SCHNEIDER, 2006).

Em relação à *E. coli*, a ação do ácido láctico ainda é contraditória. Dubal et al. (2004) e Smulders e Greer (1998) não obtiveram resultados satisfatórios na inibição de *E. coli* com uso exclusivo de ácido láctico em carne e produtos cárneos, mas o contrário foi relatado por Anang et al. (2007).

A viabilidade de *E. coli* no período de estocagem em linguiças elaboradas com carne suína, em concordância com nosso estudo, também foi encontrada por Castano et al. (2002), Lindqvist e Lindblad (2009) e Montet et al. (2009).

Em vista do exposto, uma alternativa para a inibição de bactérias patogênicas em linguiças suína frescal seria o uso concomitante de dois acidulantes. De acordo com alguns autores, a sinergia, que seria a combinação de dois compostos, pode ser mais eficaz do que quando se considera cada composto usado isoladamente (LACHOWICZ et al., 1998; PERIAGO; PALOP; FERNÁNDEZ, 2001; TASSOU; DROSINOS; NYCHAS, 1995; VAREL, 2002). Dessa forma, Nazer et al. (2005) propõem o uso de compostos antimicrobianos em combinação, com a finalidade de se alcançar uma boa segurança microbiológica dos alimentos, reduzindo as doses de cada composto no produto e garantindo, assim, a inocuidade dos alimentos.

4 CONCLUSÕES

Foram isoladas e identificadas, bioquimicamente, de linguiça suína frescal, cepas de *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus epidermidis* e, por sequenciamento da região rDNA 16S, cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurim, *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi.

Em relação ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, 65% das estirpes testadas, dentre elas *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* sp., foram consideradas multirresistentes aos antibióticos.

No teste de determinação da concentração mínima bactericida, o ácido orgânico que apresentou maior eficiência antimicrobiana *in vitro* foi o ácido láctico.

Na matriz alimentar com adição das 3 linhagens de bactérias, o tratamento com ácido láctico, nas concentrações 1,5 e 4,0 M, reduziu ligeiramente a população das bactérias ao longo do tempo de armazenamento, não sendo essa redução considerada estatisticamente significativa.

REFERÊNCIAS

ABONG'O, B. O.; MOMBA, M. N. B. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from meat and meat products sold in Amathole District, Eastern Cape Province of South Africa. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 2, p. 173-176, Apr. 2009.

ADAMS, C. A. **Nutricines**. Food components in health and nutrition. Nottingham: Nottingham University Press, 1999. v. 2.

ADESIYUN, A. A.; WEBB, L. A.; ROMAIN, H. T. Prevalence and characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bulk and composite milk and cattle handlers. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 5, p. 629-632, May 1998.

ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 7, n. 10, p. 410-413, Oct. 1999.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. **Meat Science**, Oxford, v. 81, n. 1, p. 65-70, Jan. 2009.

ANANG, D. M. et al. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4°C. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 8, p. 961-969, Aug. 2007.

ASLIM, B. et al. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **LTW/Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 38, n. 6, p. 691-694, Sept. 2005.

BACON, R. T. et al. Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multiresistant *Salmonella* strains cultured under stationary-phase acid tolerance inducing and noninducing conditions. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 66, n. 5, p. 732-740, May 2003.

BARBOSA, M. B. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de linguiças frescas de carne suína no município de Sete Lagoas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104-105, p. 20-21, 2003.

BARBUTI, S.; PAROLARI, G. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. **Meat Science**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 323-329, Nov. 2002.

BARKER, C.; PARK, S. F. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 4, p. 1594-1600, Apr. 2001.

BARTON, M. D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 13, n. 2, p. 279-299, Dec. 2000.

BEARSON, B. L.; WILSON, L.; FOSTER, J. W. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella* Typhimurium against inorganic acid stress. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 9, p. 2409-2417, May 1998.

BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors in animals management and transport regarding *Salmonella* in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-2, p. 37-53, June 1996.

BOGAARD, A. E.; STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 14, n. 4, p. 327-335, May 2000.

BOUGHTON, C. et al. Prevalence and number of *Salmonella* in Irish retail pork sausages. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, n. 9, p. 1834-1839, Sept. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 7, p. 46-53, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 14, 18 set. 2003. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 29 de dezembro de 2006. Dispõe sobre o regulamento técnico de atribuição de aditivos, e seus limites das seguintes categorias de alimentos 8: carne e produtos cárneos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 14, 4 jan. 2007. Seção 1.

BUCHANAN, R. L.; EDELSON, S. G. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 62, n. 3, p. 211-218, Mar. 1999.

CASTANO, A. et al. Survival of *Enterobacteriaceae* during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 2, p. 107-115, Mar. 2002.

CHAVES, G. M. C. et al. Avaliação bacteriológica de linguiça frescal suína comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 13, p. 48-52, jun. 2000.

CHENG, H. Y.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. **Food Research International**, Ottawa, v. 36, n. 1, p. 49-56, Jan. 2003.

CHERRINGTON, C. A. et al. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 32, p. 87-108, 1991.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 8th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2005. 58 p.

COMI, G. et al. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. **Meat Science**, Oxford, v. 69, n. 3, p. 381-392, Mar. 2005.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLL, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology, 2001. cap. 29, p. 593-627.

DAVIS, M. A. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Dublin isolates from beef and dairy sources. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 2-4, p. 221-230, Jan. 2007.

DEDIOL, C. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* en carne vacuna fresca en el área del Gran Mendoza. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102-103, p. 13-16, nov./dic. 2002.

DEL RÍO, E. et al. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 115, n. 3, p. 268-280, Apr. 2007.

DUBAL, Z. B. et al. Effect of food grade organic acids on inoculated *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* and *S. Typhimurium* in sheep/goat meat stored at refrigeration temperature. **Meat Science**, Oxford, v. 66, n. 4, p. 817-821, Apr. 2004.

ENNE, V. I. et al. A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E. coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 278, n. 2, p. 193-199, Jan. 2008.

FARIA, J. F. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* isolated from raw milk. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia**, Maracaibo, v. 9, p. 343-348, 1999.

FERREIRA, V. et al. Characterisation of *alheiras*, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 436-440, May 2007.

FONTÁN, M. C. G. et al. Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 1, p. 52-58, Feb. 2007a.

FONTÁN, M. C. G. et al. Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. **LTW/Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 40, n. 9, p. 1610-1622, Nov. 2007b.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Adaptative acidification tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 2, p. 771-778, Feb. 1990.

FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 16, p. 5129-5135, Aug. 1991.

GARREN, D. M.; HARRISON, M. A.; RUSSELL, S. M. Retention of acid tolerance and acid shock responses of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 12, p. 1478-1482, Dec. 1997.

GHOSH, S.; LAPARA, T. M. The effect of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, London, v. 1, n. 3, p. 191-203, May 2007.

GILL, C. O. The control of microbial spoilage in fresh meats. In: PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. (Ed.). **Advances in meat research**. Meat and Poultry Microbiology. Westport: AVI. Publishing Company, Inc., 1986. v. 2, p. 49-88.

GREENACRE, E. J. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20°C: optimization and modeling. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 3945-3951, July 2003.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 916-921, Apr. 2009.

HILL, C.; O'DRISCOLL, B.; BOOTH, I. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 245-254, Dec. 1995.

HSIAO, C. P.; SIEBERT, K. J. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 189-201, Mar. 1999.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. ICMSF, 1992.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JOHNSTON, R. W.; TOMPKIN, R. B. Meat and Poultry Products. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3rd ed. Washington: American Public Health Association, 1992. cap. 44, p. 821-836.

JORDAN, E. et al. *Salmonella* surveillance in raw and cooked meat and meat products in the Republic of Ireland from 2002 to 2004. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 112, n. 1, p. 66-70, Oct. 2006.

KANELLOS, T. S.; BURRIEL, A. R. The bactericidal effects of lactic acid and trisodium phosphate on *Salmonella* Enteritidis serotype pt4, total viable counts and counts of *Enterobacteriaceae*. **Food Protection Trends**, v. 25, p. 346-350, May 2005.

KOO, J.; MARSHALL, D. L.; DE PAOLA, A. Antacid increased survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage in a gastrointestinal model. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 7, p. 2895-2902, July 2002.

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

LACHOWICZ, K. J. et al. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 209-214, Mar. 1998.

LEE, I. S.; SLONCZEWSKI, J. L.; FOSTER, J. W. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella* typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 5, p. 1422-1426, Mar. 1994.

LEENANON, B.; DRAKE, M. A. Acid stress, starvation and cold stress affect poststress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 7, p. 970-974, July 2001.

LEYER, G. J.; JOHNSON, E. A. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 6, p. 2075-2080, June 1992.

LIM, S. K. et al. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 283-286, May 2007.

LIN, J. et al. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella* typhimurium, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 14, p. 4097-4104, July 1995.

LINDQVIST, R.; LINDBLAD, M. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 59-67, Jan. 2009.

LISERRE, A. M. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strains in modified atmosphere-packaged brazilian sausage. **Meat Science**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 449-455, Aug. 2002.

LITTLE, C. L. et al. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. **Food Microbiology**, London, v. 25, n. 3, p. 538-543, May 2008.

MAGWIRA, C. A.; GASHE, B. A.; COLLISON, E. K. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* O157:H7 in beef products from retail outlets in Gaborone, Botswana. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 68, n. 2, p. 403-406, Feb. 2005.

MANERU, L; GARCIA-JALÓN, I. *Listeria monocytogenes* en alimentos disponibles en el mercado de Pamplona. **Alimentaria**, Harac, v. 33, n. 267, p. 39-43, 1995.

MARQUES, S. et al. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras, MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1120-1123, nov./dez. 2006.

MEHYAR, G. et al. Effectiveness of trisodium phosphate, lactic acid and commercial antimicrobials against pathogenic bacteria on chicken skin. **Food Protection Trends**, v. 25, p. 351-362, 2005.

METAXOPOULOS, J.; SAMELIS, J.; PAPADELLI, M. Technological and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece. **Italian Journal of Food Science**, Pinerolo, v. 13, n. 1, p. 3-18, 2001.

MONTET, M. P. et al. Fate of acid-resistant and non-acid resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in experimentally contaminated French fermented raw meat sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 129, n. 3, p. 264-270, Feb. 2009.

MOROT-BIZOT, S. C.; LEROY, S.; TALON, R. Staphylococcal community of a small unit manufacturing traditional dry fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 210-217, Apr. 2006.

NAKAI, S. A.; SIEBERT, K. J. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 3, p. 249-255, Sept. 2003.

NASTASIJEVIC, I.; MITROVIC, R.; BUNCIC, S. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. **Meat Science**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 101-105, May 2009.

NAZER, A. I. et al. Combinations of food antimicrobials at low-levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 5, p. 391-398, Oct. 2005.

NYCHAS, G. J. E. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, Oxford, v. 78, n. 1-2, p. 77-89, Jan./Feb. 2008.

OLIVEIRA, C. Z. F. et al. Susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de Queijo Minas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 30, abr./maio 1999.

PELISSER, M. R. et al. Ocurrance of *Staphylococcus aureus* and multiplex per detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 145-148, Jan./Mar. 2009.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; PEREIRA, J. L. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas em alimentos experimentalmente inoculados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 171-175, maio/ago. 2001.

PERIAGO, P. M.; PALOP, A.; FERNÁNDEZ, P. S. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heattreated vegetative cells. **Food Science and Technology International**, Madrid, v. 7, n. 6, p. 487-492, Dec. 2001.

PIGNATO, S. et al. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of Salmonellae in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1996-1999, May 1995.

PRENDERGAST, D. M. et al. Prevalence, numbers and characteristics of *Salmonella* spp. on Irish retail pork. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 2-3, p. 233-239, May 2009.

RAPINI, L. S. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 130-133, fev. 2004.

RICKE, S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, Menasha, v. 82, n. 4, p. 632-639, Apr. 2003.

RUSSEL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, n. 5, p. 363-370, Nov. 1992.

SAMELIS, J. et al. Stability and safety of traditional Greek salami – a microbiological ecology study. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 1-2, p. 69-82, Oct. 1998.

SAMELIS, J. et al. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, Fort Collins, v. 38, n. 1, p. 21-28, Feb. 2005.

SAYAH, R. S. et al. Patterns of antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1394-1404, Mar. 2005.

SENGELOV, G. et al. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. **Environment International**, Amsterdam, v. 28, n. 7, p. 587-595, Jan. 2003.

SILVA, W. P. et al. *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 911-916, maio/jun. 2004.

SLAMA, K. B. et al. Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 281-286, Feb. 2010.

SMULDERS, F. J. M.; GREER, G. G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, n. 3, p.149-169, Nov. 1998.

SPRICIGO, D. A. et al. Prevalence and profile of resistance to antimicrobials of *Salmonella* serovars isolated from raw pork sausage in Lages, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 517-520, Apr. 2008.

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26n. 1, p. 41-45, jan./mar. 2006.

STANLEY, K.; JONES, K. Cattle and sheep farms as reservoir of *Campylobacter*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 104-113, 2003.

TASSOU, C. C.; DROSINOS, E. H.; NYCHAS, G. J. E. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella* enteritidis and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4°C and 10°C. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, p. 593-600, 1995.

WANG, X. et al. Diversity stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 106-115, July 2006.

WATERMAN, S. R.; SMALL, P. L. C. Identification of sigma S-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 925-940, Sept. 1996.

WATERMAN, S. R.; SMALL, P. L. C. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3882-3886, Oct. 1998.

VAREL, V. H. Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. **Current Microbiology**, New York, v. 44, n. 1, p. 38-43, Jan. 2002.

YUK, H. G.; SCHNEIDER, K. R. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 7, p. 694-700, Oct. 2006.

ZHAO, S. et al. Characterization of multidrug resistant *Salmonella* recovered from diseased animals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 123, n. 1-3, p. 122-132, July 2007.

APÊNDICE

Tabela 1A Halos de inibição das estirpes de *E.coli* frente aos ácidos acético e lático

Ácidos	Estirpes													Média
	UFLA EC 5	UFLA EC 12	UFLA EC 13	UFLA EC 14	UFLA EC 37	UFLA EC 38	UFLA EC 41	UFLA EC 47	UFLA EC 50	UFLA EC 66	UFLA EC 67	UFLA EC 68	UFLA EC 69	
Acético	7,96^{aA}	6,63 ^{bA}	7,13 ^{bA}	7,58^{aA}	8,38^{aA}	7,83^{aA}	7,54^{aA}	7,83^{aA}	6,88 ^{bA}	5,71 ^{cA}	7,13 ^{bA}	7,58^{aA}	7,25 ^{bA}	7,34
Lático	4,77 ^{cB}	4,42 ^{cB}	4,54 ^{cB}	5,38 ^{bB}	3,54 ^{dB}	5,04 ^{bB}	4,29 ^{cB}	4,25 ^{cB}	4,63 ^{cB}	4,50 ^{cB}	4,50 ^{cB}	4,04 ^{dB}	6,17 ^{aB}	4,62
Média	6,37	5,52	5,84	6,48	5,96	6,44	5,92	6,04	5,75	5,11	5,82	5,81	6,71	

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Para cada coluna, valores com letras minúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1B Halos de inibição das estirpes de *Salmonella* spp. frente aos ácidos acético e lático

Ácidos	Estirpes			Média
	UFLA SALM 46	UFLA SALM 52	UFLA SALM 57	
Acético	6,70 ^b	8,17^a	6,96 ^b	7,27
Lático	NS	NS	NS	NS

Para cada coluna, valores com letras minúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1C Halos de inibição das estirpes de *Staphylococcus* sp. frente aos ácidos acético e lático

Ácidos	Estirpes					Média
	UFLA STAP 33	UFLA STAP 34	UFLA STAP 37	UFLA STAP 38	UFLA STAP 69	
Acético	1,08 ^{ab}	0,65 ^{bb}	0,60 ^{bb}	0,48 ^{bb}	1,35 ^{ab}	0,83
Lático	1,65 ^{ba}	2,60^{aa}	2,25^{aa}	1,90 ^{ba}	2,31^{aa}	2,14
Média	1,36	1,62	1,43	1,19	1,83	

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Para cada coluna, valores com letras minúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1D Halos de inibição das estirpes de *E.coli* frente aos ácidos acético e lático nas diferentes concentrações

Ácidos	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
Acético	2,36^A	3,56^A	5,00^A	6,72^A	8,56^A	9,85^A	10,41^A	12,26^A	7,34	$0,92 + 2,85x$ $R^2 = 99,14\%$
Lático	0,58 ^B	1,33 ^B	2,85 ^B	4,36 ^B	5,44 ^B	6,31 ^B	7,49 ^B	8,62 ^B	4,62	$-0,65 + 2,35x$ $R^2 = 99,47\%$
Média	1,47	2,45	3,92	5,54	7,00	8,08	8,95	10,44		

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1E Halos de inibição das estirpes de *Salmonella* spp. frente aos ácidos acético e láctico nas diferentes concentrações

Ácidos	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
Acético	1,78 ^A	2,67 ^A	4,78^A	7,00^A	8,89^A	10,11^A	10,89^A	12,11^A	7,27	0,24 + 3,13x R ² = 97,91%
Lático	1,00 ^A	2,00 ^A	2,78 ^B	3,67 ^B	4,22 ^B	5,22 ^B	6,33 ^B	6,89 ^B	4,01	0,22 + 1,69x R ² = 99,60%
Média	1,39	2,33	3,78	5,33	6,56	7,67	8,61	9,50		

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1F Halos de inibição das estirpes de *Staphylococcus* sp. frente aos ácidos acético e láctico nas diferentes concentrações

Ácidos	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
Acético	0,13 ^A	0,23 ^A	0,40 ^B	0,60 ^B	0,97 ^B	1,10 ^B	1,27 ^B	1,97 ^B	0,83	- 0,26 + 0,48x R ² = 93,97%
Lático	0,07 ^A	0,53 ^A	1,10^A	1,80^A	2,47^A	2,83^A	3,73^A	4,60^A	2,14	- 0,73 + 1,28x R ² = 99,11%
Média	0,10	0,38	0,75	1,20	1,72	1,97	2,50	3,28		

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1G Absorbância das estirpes de *E. coli* frente aos ácidos acético e láctico

Ácidos	Estirpes													Média
	UFLA EC 5	UFLA EC 12	UFLA EC 13	UFLA EC 14	UFLA EC 37	UFLA EC 38	UFLA EC 41	UFLA EC 47	UFLA EC 50	UFLA EC 66	UFLA EC 67	UFLA EC 68	UFLA EC 69	
Acético	1,15 ^{cB}	1,32 ^{dB}	1,32 ^{dB}	0,81 ^{aA}	1,16 ^{cB}	1,44 ^{eB}	1,34 ^{dB}	1,37 ^{dB}	1,42 ^{eB}	1,13 ^{cB}	0,78 ^{aA}	1,11 ^{cB}	0,94 ^{bB}	1,18
Lático	0,82^{aA}	0,90 ^{bA}	0,92 ^{bA}	0,85 ^{bB}	0,77^{aA}	0,91 ^{bA}	0,89 ^{bA}	1,14 ^{dA}	0,99 ^{cA}	0,94 ^{bA}	0,76^{aA}	1,04 ^{cA}	0,88 ^{bA}	0,91
Média	0,98	1,11	1,12	0,83	0,97	1,17	1,11	1,26	1,21	1,03	0,77	1,07	0,91	

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Para cada coluna, valores com letras minúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1H Absorbância das estirpes de *Salmonella* spp. frente aos ácidos acético e láctico

Ácidos	Estirpes			Média
	UFLA SALM 46	UFLA SALM 52	UFLA SALM 57	
Acético	0,71 ^{aB}	0,96 ^{bB}	1,20 ^{cB}	0,96
Lático	0,59^{aA}	0,64^{aA}	0,61^{aA}	0,61
Média	0,65	0,80	0,90	

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Para coluna, valores com letras minúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1I Absorbância das estirpes de *Staphylococcus* sp. frente aos ácidos acético e láctico

Ácidos	Estirpes					Média
	UFLA STAP 33	UFLA STAP 34	UFLA STAP 37	UFLA STAP 38	UFLA STAP 69	
Acético	1,25 ^{cB}	1,29 ^{cB}	1,25 ^{cB}	0,71 ^{aA}	0,81 ^{bB}	1,06
Lático	0,69 ^{bA}	1,09 ^{dA}	0,86 ^{cA}	0,85 ^{cB}	0,45^{aA}	0,79
Média	0,97	1,19	1,05	0,78	0,63	

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Para cada coluna, valores com letras minúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1J Absorbância das estirpes de *E. coli* em diferentes concentrações dos ácidos e equação de regressão de cada estirpe em função da molaridade

Estirpes	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
UFLA EC 5	1,29 ^B	1,00 ^B	0,93 ^B	0,96 ^B	0,91 ^A	0,93^A	0,89^A	0,94 ^B	0,98	$0,06x^2 - 0,34x + 1,37$ $R^2 = 80,71\%$
UFLA EC 12	1,34 ^C	1,18 ^C	1,12 ^C	1,08 ^C	1,05 ^B	1,04 ^B	1,02 ^B	1,04 ^C	1,11	$0,04x^2 - 0,26x + 1,43$ $R^2 = 96,83\%$
UFLA EC 13	1,36 ^C	1,06 ^C	1,05 ^C	1,05 ^C	1,14 ^C	1,09 ^B	1,15 ^B	1,05 ^C	1,12	$0,04x^2 - 0,22x + 1,35$ $R^2 = 40,49\%$
UFLA EC 14	0,62^A	0,66^A	0,70^A	0,80^A	0,98^A	0,99^A	0,98^A	0,91 ^B	0,83	$-0,04x^2 + 0,29x + 0,43$ $R^2 = 87,28\%$
UFLA EC 37	1,17 ^B	1,14 ^C	0,93 ^B	0,79^A	0,92^A	0,89^A	0,92^A	0,95 ^B	0,96	$0,07x^2 - 0,37x + 1,36$ $R^2 = 80,15\%$
UFLA EC 38	1,55 ^D	1,30 ^D	1,18 ^D	1,18 ^C	1,08 ^B	1,05 ^B	1,07 ^B	0,98 ^B	1,17	$0,05x^2 - 0,36x + 1,66$ $R^2 = 93,18\%$
UFLA EC 41	1,19 ^B	1,16 ^C	1,08 ^C	1,10 ^C	1,08 ^B	1,10 ^B	1,11 ^B	1,09 ^C	1,11	$0,02x^2 - 0,11x + 1,24$ $R^2 = 77,08\%$
UFLA EC 47	1,32 ^C	1,29 ^D	1,21 ^D	1,19 ^C	1,24 ^C	1,28 ^C	1,26 ^C	1,27 ^D	1,26	$0,03x^2 - 0,12x + 1,37$ $R^2 = 59,35\%$
UFLA EC 50	1,44 ^D	1,34 ^D	1,21 ^D	1,18 ^C	1,17 ^C	1,18 ^C	1,12 ^B	1,03 ^C	1,21	$0,02x^2 - 0,19x + 1,50$ $R^2 = 90,52\%$

Tabela 1J, continuação

Estirpes	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
UFLA EC 66	1,15 ^B	0,93 ^B	0,95 ^B	1,04 ^C	1,07 ^B	1,07 ^B	1,08 ^B	0,99 ^B	1,03	$0,01x^2 - 0,04x + 1,06$ $R^2 = 1,83\%$
UFLA EC 67	0,68^A	0,72^A	0,75^A	0,75^A	0,82^A	0,80^A	0,85^A	0,81^A	0,77	$-0,01x^2 + 0,10x + 0,63$ $R^2 = 91,35\%$
UFLA EC 68	1,19 ^B	0,89 ^B	0,94 ^B	1,11 ^C	1,16 ^C	1,13 ^B	1,14 ^B	1,02 ^C	1,07	$-0,00x^2 + 0,03x + 1,03$ $R^2 = 3,72\%$
UFLA EC 69	1,17 ^B	0,77^A	0,85 ^B	0,92 ^B	0,93^A	0,92^A	0,90^A	0,85^A	0,91	$0,03x^2 - 0,16x + 1,09$ $R^2 = 21,22\%$
Média	1,19	1,03	0,99	1,01	1,04	1,04	1,04	0,99		

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1K Absorbância das estirpes de *Staphylococcus* sp. em diferentes concentrações dos ácidos e equação de regressão de cada estirpe em função da molaridade

Estirpes	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
UFLA STAP 33	1,36 ^D	1,17 ^C	0,97 ^C	0,92 ^C	0,89 ^B	0,87 ^B	0,76 ^B	0,80 ^B	0,97	$0,06x^2 - 0,42x + 1,53$ $R^2 = 96,17\%$
UFLA STAP 34	1,44 ^D	1,26 ^D	1,19 ^E	1,18 ^D	1,15 ^D	1,15 ^D	1,13 ^D	1,05 ^D	1,19	$0,03x^2 - 0,21x + 1,48$ $R^2 = 87,48\%$
UFLA STAP 37	1,26 ^C	1,09 ^C	1,07 ^D	1,11 ^D	1,04 ^C	1,00	0,94 ^C	0,92 ^C	1,05	$0,01x^2 - 0,12x + 1,27$ $R^2 = 85,23\%$
UFLA STAP 38	0,62^A	0,69 ^B	0,74 ^B	0,80 ^B	0,81 ^B	0,90 ^B	0,84 ^B	0,84 ^B	0,78	$-0,03x^2 + 0,20x + 0,52$ $R^2 = 94,19\%$
UFLA STAP 69	0,97 ^B	0,58^A	0,56^A	0,60^A	0,59^A	0,62^A	0,56^A	0,57^A	0,63	$0,06x^2 - 0,33x + 1,00$ $R^2 = 59,24\%$
Média	1,13	0,96	0,90	0,92	0,90	0,91	0,85	0,84		

Para cada linha, valores com letras maiúsculas distintas são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1L Absorbância das estirpes de *E. coli* em diferentes concentrações dos ácidos acético e lático e equação de regressão dos ácidos em função da molaridade

Ácidos	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
Acético	1,35 ^B	1,10 ^B	1,09 ^B	1,14 ^B	1,20 ^B	1,18 ^B	1,20 ^B	1,15 ^B	1,18	$0,03x^2 - 0,15x + 1,32$ $R^2 = 25,45\%$
Lático	1,03^A	0,96^A	0,90^A	0,88^A	0,89^A	0,89^A	0,88^A	0,84^A	0,91	$0,02x^2 - 0,121x + 1,07$ $R^2 = 87,53\%$
Média	1,19	1,03	0,99	1,01	1,04	1,04	1,04	0,99		

Para cada linha, valores com letras maiúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1M Absorbância das estirpes de *Salmonella* spp. em diferentes concentrações dos ácidos acético e lático e equação de regressão dos ácidos em função da molaridade

Ácidos	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
Acético	1,42 ^B	1,11 ^B	1,02 ^B	0,93 ^B	0,84 ^B	0,77 ^B	0,77 ^B	0,82 ^B	0,96	$0,08x^2 - 0,51x + 1,62$ $R^2 = 97,40\%$
Lático	0,91^A	0,63^A	0,58^A	0,56^A	0,56^A	0,54^A	0,56^A	0,56^A	0,61	$0,06x^2 - 0,35x + 1,00$ $R^2 = 83,35\%$
Média	1,17	0,87	0,80	0,74	0,70	0,65	0,66	0,69		

Para cada linha, valores com letras maiúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito

Tabela 1N Absorbância das estirpes *Staphylococcus* sp. em diferentes concentrações dos ácidos acético e lático e equação de regressão dos ácidos em função da molaridade

Ácidos	Molaridade								Média	Equação
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0		
Acético	1,26 ^B	1,04 ^B	1,04 ^B	1,08 ^B	1,06 ^B	1,06 ^B	0,97 ^B	0,98 ^B	1,06	0,02x ² - 0,13x + 1,25 R ² = 60,77%
Lático	1,00^A	0,87^A	0,77^A	0,76^A	0,74^A	0,75^A	0,73^A	0,69^A	0,79	0,03x ² - 0,22x + 1,07 R ² = 91,18%
Média	1,13	0,96	0,91	0,92	0,90	0,91	0,85	0,84		

Para cada linha, valores com letras maiúsculas diferentes são significativos a $p < 0,05$ pelo teste de Scott-Knott. Os melhores resultados estão marcados em negrito