

**Atividade antimicrobiana do urucum, ácido fosfórico e Biomax D® contra
Listeria monocytogenes em salsicha**

**Antimicrobial activity of urucum, phosphoric acid and Biomax D® against
Listeria monocytogenes in sausage**

DOI:10.34117/bjdv6n11-426

Recebimento dos originais: 20/10/2020

Aceitação para publicação: 19/11/2020

Ana Paula Chaves

Engenheira de Alimentos

Cooperativa Central Aurora Alimentos

Endereço: Rua Iguaçu, 427 E, Bairro: Saic, CEP: 89802-170, Chapecó, Santa Catarina, Brasil

E-mail: ana-chaves@auroraalimentos.com.br

Rubieli Carla Frezza Zeferino

Mestre em Engenharia de Alimentos

Universidade Comunitária da Região de Chapecó – UNOCHAPECÓ

Endereço: Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Servidão Anjo da Guarda, 295-D, Bairro Efapi, CEP 89.809-900, Chapecó, Santa Catarina, Brasil

E-mail: rubifrezza@unochapeco.edu.br

Gustavo de Pinho Oliveira

Mestrado em Engenharia de Alimentos

Cooperativa Central Aurora Alimentos

Endereço: Rua Visconde de Cairú, 310, Apto. 202 Bloco D, CEP: 89805-057, Chapecó Santa Catarina, Brasil

Email: gustavopinhoea@gmail.com

Eliziane Tais Zambiasi

Engenheira de Alimentos

Cooperativa Central Aurora Alimentos

Endereço: Rua Belilde Trevisol Oro, 48, Bairro Progresso, CEP: 89900-000, São Miguel do Oeste, Santa Catarina, Brasil

E-mail: elizianezambiasi@gmail.com

Mirian Cristina Enderle

Engenheira de Alimentos

Cooperativa Central Aurora Alimentos

Endereço: BR-282, CEP 89870-000, Pinhalzinho, Santa Catarina, Brasil

E-mail: mirian_enderle@hotmail.com

Aniela Pinto Kempka

Doutorado em Engenharia Química

Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química - UDESC
Endereço: Rua Fernando de Noronha, s/n°, Margens da BR 282, CEP: 89870-000, Pinhalzinho, Santa Catarina, Brasil
E-mail: aniela.kempka@udesc.br

Liziane Schittler Moroni

Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química - UDESC
Endereço: Rua Fernando de Noronha, s/n°, Margens da BR 282, CEP: 89870-000, Pinhalzinho, Santa Catarina, Brasil
E-mail: liziane.schittler@udesc.br

RESUMO

Os produtos cárneos são frequentemente identificados como responsáveis por surtos e casos de listeriose. Compostos naturais como, extratos de plantas e frutos podem apresentar atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antilisterial do urucum e ácido fosfórico, compostos utilizados na etapa de tingimento da salsicha, bem como do Biomax D[®] (extrato de pomelo e ácido ascórbico). Inicialmente, avaliou-se atividade antimicrobiana *in vitro* do urucum, ácido fosfórico e Biomax D[®] contra *L. monocytogenes*. Os compostos demonstraram atividade antilisterial, no entanto, quando incorporado em alimentos esta ação antimicrobiana pode ser influenciada pelos componentes da matriz alimentar. Para isto, salsichas foram contaminadas com diferentes concentrações de *L. monocytogenes* e submetidas aos tratamentos: T1 - 2,0% de urucum; T2 - 1,5% de ácido fosfórico; T3 - 2,0% de urucum e 1,5% de ácido fosfórico; T4 - 5,0% de Biomax D[®]; T5 - 5,0% de Biomax D[®] e 2,0% de urucum; T6 - 5,0% de Biomax D[®] e 1,5% de ácido fosfórico; T7 - 5,0% de Biomax D[®], 2,0% de urucum e 1,5% de ácido de ácido fosfórico e armazenadas a 4 °C por 10 dias. Nos tempos zero, 5 e 10 dias, as salsicha foram submetidas as contagens de *Listeria spp.* em ágar Oxford e por PCR confirmou-se espécie *L. monocytogenes*. Verificou-se que o urucum, o ácido fosfórico e o Biomax D[®] quando aplicados individualmente ou em conjunto apresentam atividade antilisterial em salsichas. A etapa de tingimento da salsicha pode contribuir para o controle deste micro-organismo. Além disso, o Biomax D[®] é um antimicrobiano natural, com potencial de utilização em salsicha.

Palavras-Chave: Atividade antilisterial, produto cárneo, segurança alimentar.

ABSTRACT

Meat products are often identified as responsible for outbreaks and cases of listeriosis. Natural compounds such as plant and fruit extracts may have antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. The present study aimed to evaluate the antilisterial activity of annatto and phosphoric acid, compounds used in the sausage dyeing stage, as well as Biomax D[®] (pomelo extract and ascorbic acid). Initially, *in vitro* antimicrobial activity of annatto, phosphoric acid and Biomax D[®] against *L. monocytogenes* was evaluated. The compounds showed antilisterial activity, however, when incorporated into foods this antimicrobial action can be influenced by the components of the food matrix. For this, sausages were contaminated with different concentrations of *L. monocytogenes* and submitted to treatments: T1 - 2.0 % of annatto; T2 - 1.5 % phosphoric acid; T3 - 2.0 % of annatto and 1.5 % of phosphoric acid; T4 - 5.0 % Biomax D[®]; T5 - 5.0 % of Biomax D[®] and 2.0 % of annatto; T6 - 5.0 % Biomax D[®] and 1.5 % phosphoric acid; T7 - 5.0 % of Biomax D[®], 2.0 % of annatto and 1.5 %

of phosphoric acid and stored at 4 ° C for 10 days. At zero, 5 and 10 days, the sausages were subjected to *Listeria spp.* on Oxford agar and PCR, *L. monocytogenes* was confirmed. It was found that annatto, phosphoric acid and Biomax D[®] when applied individually or together have antilisterial activity in sausages. The sausage dyeing step can contribute to the control of this microorganism. In addition, Biomax D[®] is a natural antimicrobial, with potential for use in sausages.

Keywords: Antilisterial activity, meat product, food safe.

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) continuam sendo a principal causa de problemas mundiais de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Dentre os micro-organismos envolvidos destaca-se a *L. monocytogenes*.

A *L. monocytogenes* é uma bactéria intracelular facultativa causadora da listeriose, uma doença transmitida por alimentos. Apesar da incidência de listeriose ser relativamente baixa, a gravidade da doença é alta dentro do grupo de risco, mulheres grávidas, crianças, idosos e imunocomprometidos, podendo provocar aborto, infecções no sistema nervoso central (meningite, encefalite) e septicemia (Shen *et al.*, 2015, 2016).

Produtos cárneos têm sido identificados como fontes de surtos e casos de listeriose (Rodrigues *et al.*, 2017), sendo a carne, uma fonte importante de contaminação por *L. monocytogenes* (Morais, 2015). Este micro-organismo tem capacidade de colonizar superfícies em plantas de processamento de alimentos e de formar biofilmes, o que pode torná-lo persistente em abatedouros e indústrias de beneficiamento de carne e derivados (Wang *et al.*, 2015).

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína, produzindo em 2019, 3.983 milhões de toneladas, destas 750 mil toneladas foram exportadas (ABPA, 2020). No mercado brasileiro interno, 89% da carne é comercializada na forma de industrializados (ABPA, 2014). Dentre eles, destaca-se salsicha.

A salsicha é o produto cárneo industrializado, obtido da emulsão de carne de uma ou mais espécies de animais de açougue, adicionados de ingredientes, embutido em envoltório natural, ou artificial ou por processo de extrusão, e submetido a um processo térmico adequado. Este produto, poderá passar pelo processo de tingimento, depelagem, defumação bem como apresentar recheios e molhos segundo a Normativa do MAPA nº 4 de 31/03/ 2000.

O processo de tingimento consiste na imersão da salsicha em 2 % (g/v) do corante urucum à temperatura de 4 °C e banho com ácido fosfórico 1,5 % (v/v), com o intuito de neutralizar o pH e fixar a cor alaranjada-vermelha ao produto. De acordo com Taham *et al.* (2015) e Fadda *et al.*, (2010), o

corante de urucum e o ácido fosfórico utilizados na etapa de tingimento da salsicha, podem apresentar atividade antimicrobiana, respectivamente.

Pesquisadores e indústrias buscam constantemente soluções inovadoras e estratégias eficazes para controlar *L. monocytogenes* nas indústrias de alimentos (Josewin et al., 2018; Espina et al., 2013).

O Biomax D® é um produto natural composto por extrato de pomelo (*Citrus maxima*) e ácido ascórbico, não apresenta cor, odor e sabor, utilizado no controle de bolores e leveduras em indústrias de panificação, porém, também apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias como *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus hemolyticus* e *L. monocytogenes* (Prozin, 2013). O Biomax D® é comercializado no Brasil, e não necessita registro por conter extratos de plantas em sua formulação, conforme preconiza a Resolução nº 23, de 15 de março de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que dispõe sobre os Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos.

Devido ao exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do urucum, ácido fosfórico e Biomax D® (extrato de pomelo e ácido ascórbico) contra *Listeria monocytogenes*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Utilizou-se salsicha suína fornecida por uma agroindústria do oeste de Santa Catarina, Brasil. As salsichas foram mantidas em embalagem a vácuo e transportadas em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química (DEAQ) da Universidade do Estado de Santa Catarina.

O corante de urucum e o ácido fosfórico foram fornecidos gentilmente pelas empresas Kraki e ICL Brasil Ltda, localizadas nas cidades de Santo André e de São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil, respectivamente. O Biomax D® foi fornecido pela Prozyn Indústria Comércio Ltda, localizada na cidade de Butantã, São Paulo, Brasil.

A cepa de *L. monocytogenes* Scott A pertencente à coleção do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do DEAQ foi mantida em Tryptic Soy Agar Yeast Extract (TSA-YE/Oxoid) adicionado de 1,5 % de ágar-ágar (Oxoid) sob refrigeração. Para as avaliações, a cepa foi repicada para caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI/OXOID) e incubada a 30 °C por 24 horas. A cultura foi

diluída em solução salina peptonada a 0,1 % (Merck) até a concentração de 0,5 da escala de Mac Farland, correspondente a 10^8 Unidades Formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Atividade antimicrobiana *in vitro* do urucum e do ácido fosfórico contra *L. monocytogenes*

Em tubo estéril, adicionou-se 9 mL da substância antimicrobiana (2,0 % de urucum ou 1,5% de ácido fosfórico ou 5,0% de Biomax D[®]), 1 mL de leite UHT (Aurora, Pinhalzinho, SC, Brasil) e 100 µL da cultura de *L. monocytogenes*, denominado tubo teste. Nos tempos 30 segundos, 1, 1.3, 5 e 10 minutos do tubo teste transferiu-se 10 µL para 9 mL de caldo BHI. Incubaram-se os tubos a 37 °C por 24 horas. Foram testadas as concentrações de 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 log UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes*.

2.2.2 Atividade antimicrobiana do urucum e do ácido fosfórico contra *L. monocytogenes* em salsicha

Para cada tratamento e no controle foram utilizado 100 g de salsicha. Inicialmente, as salsichas foram imersas em solução contendo *L. monocytogenes* e submetidas aos tratamentos: Tratamento 1, imersão em 2,0 % (v/v) de urucum por 60 segundos; Tratamento 2, imersão em 1,5 % (v/v) de ácido fosfórico por 50 segundos; Tratamento 3, imersão em 2% (v/v) urucum e ácido fosfórico 1,5 % (v/v), por 60 e 50 segundos, respectivamente. Após os tratamentos, as salsichas foram submetidas a contagem de *L. monocytogenes* em ágar Oxford (Merck). Colônias típicas, cor verde azulada ao redor de halos pequenos de cor preta foram contadas e os resultados expressos em log UFC.g⁻¹.

2.2.3 Atividade antimicrobiana do urucum, do ácido fosfórico e do Biomax D[®] em salsicha durante armazenamento a 4 °C por 10 dias

Para a avaliação, as salsichas foram contaminadas com *L. monocytogenes* e submetidas aos tratamentos: Tratamento 1, imersão em 2,0% (v/v) de urucum por 60 segundos; Tratamento 2, imersão em 1,5 % (v/v) de ácido fosfórico por 50 segundos; Tratamento 3, imersão em 2% (v/v) urucum e ácido fosfórico 1,5 % (v/v), por 60 e 50 segundos, respectivamente. Tratamento 4, imersão em 5,0 % (v/v) de Biomax D[®] por 60 segundos; Tratamento 5, imersão em 5,0 % (v/v) de Biomax D[®] e 2 % (v/v) de urucum, ambos por 60 segundos; Tratamento 6, imersão em 5,0 % (v/v) de Biomax D[®] e 1,5 % (v/v) de ácido fosfórico, por 60 e 50 segundos, respectivamente; Tratamento 5, imersão em 5,0 % (v/v) de Biomax D[®], 2 % (v/v) de urucum e 1,5 % (v/v) de ácido fosfórico, por 60, 60 e 50 segundos respectivamente. Controle, salsicha sem nenhum tratamento.

Nos tempos zero, 5 e 10 dias de armazenamento foram realizadas contagens de *L. monocytogenes* em ágar Oxford (Merck).

2.2.4 Confirmação de *L. monocytogenes* por PCR

Os isolados obtidos em ágar Oxford foram recuperados em caldo BHI e incubados a 35 °C por 24 h. Os DNA's foram extraídos conforme descrito pelo fabricante Wizard® SV Genomic DNA Extraction System. Verificou-se a qualidade da extração do DNA através da mistura de DNA e corante GelRed 20 X (Biotium Inc., Hayward, USA) na proporção 5:1, que foi submetida a eletroforese (LPS – 300V, Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 1% em tampão Tris Borato EDTA (TBE) 0,5X, e visualizada sob luz UV em transiluminador (LTB – 21x26 HI, Loccus Biotecnologia). Para a identificação da espécie *L. monocytogenes*, foram utilizados os oligonucleotídeos *inlA1* (5'ACGAGTAACGGGACAAATGC 3') e *inlA2* (5'CCCGACAGTGGTGCTAGATT3'), conforme descrito por Liu *et al.* (2007). Os *primers* foram avaliados quanto à especificidade utilizando-se o Blast – like Alignment Tool (Blast), através do software “Basic Alignment Search Tool” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>). Os *primers inlA1* e *inlA2* amplificam um fragmento de 800 pb.

Cada reação de 25 µL foi constituída de 12,5 µL de Kit para PCR “Go Taq Green Master Mix 2x” (Promega Corp.), 10 pMol de cada oligonucleotídeo, 1,0 µL de DNA e água ultra-pura até completar o volume final. As reações foram submetidas à amplificação em termociclador (Aeris – BG096, ESCO®) com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min., seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 20 seg., anelamento a 55 °C por 20 seg., extensão a 72 °C por 50 seg. e extensão final a 72 °C por 2 min. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese (LPS – 300V, Loccus Biotecnologia) em gel de agarose 2,0% (p/v) (Backer Analyzed), utilizando-se como marcador o Ladder 100pb (Invitrogen™), como controle positivo de *L. monocytogenes* Scott A e, como controle negativo, todos os reagentes e água ultra-pura esterilizada em lugar do DNA. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com GelRed 20 X (Biotium Inc., Hayward, USA) e visualizado sob luz UV em transiluminador (LTB – 21x26 HI, Loccus Biotecnologia).

2.2.5 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata. As contagens de *L. monocytogenes* (\log_{10} UFC.g⁻¹) foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey, com nível de 95 % de confiabilidade. Utilizou-se o software livre Assistat 7.7beta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podem ser visualizados, a presença ou ausência de atividade antimicrobiana *in vitro* do corante de urucum, do ácido fosfórico e do Biomax D® contra *L. monocytogenes* Scott A nas diferentes concentrações do micro-organismo e tempos de contato.

Observa-se que o ácido fosfórico, urucum e Biomax D® apresentam atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. No entanto, a presença de atividade varia de acordo com o composto, concentração de micro-organismo e tempo de contato.

Tabela 1 – Presença (-) ou ausência (+) de atividade antimicrobiana do urucum, ácido fosfórico e do Biomax D® contra *L. monocytogenes* em diferentes concentrações (log UFC.mL⁻¹) e tempos (min) de contato.

<i>L. monocytogenes</i> (log UFC.mL ⁻¹)	Urucum (2,0%v/v)					Ácido Fosfórico (1,5%v/v)					Biomax D® (5,0 %v/v)				
	Tempo (min)					Tempo (min)					Tempo (min)				
	0,5	1,0	1,3	5,0	10	0,5	1,0	1,3	5,0	10	0,5	1,0	1,3	5,0	10,0
2,0	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3,0	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4,0	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5,0	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) houve crescimento do micro-organismo.

(-) não houve crescimento do micro-organismo.

O corante de urucum apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 2,0 log UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes*, em todos os tempos de contato (Tabela 1). Já na concentração de 3,0 log UFC.g⁻¹ do micro-organismo, apenas após 10 min de contato com o urucum. Este resultado demonstrando, que o urucum na concentração de 2,0 % possui efeito antimicrobiano limitado, diretamente relacionado com a concentração de *L. monocytogenes* e tempo de contato.

A atividade antilisterial do urucum também é relatada por Majolo *et al.* (2013) em seu estudo com extratos de sementes secas do fruto.

O ácido fosfórico apresenta atividade antimicrobiana nas concentrações entre 2,0 e 5,0 log UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* com tempo de contato superior a 1 mim (Tabela 1). Observa-se que a atividade antilisterial do ácido fosfórico está diretamente relacionada com o tempo de contato.

A atividade antimicrobiana de ácidos alimentícios, como o fosfórico, está relacionada com a redução do pH do meio, conseqüentemente tornando um ambiente hostil aos micro-organismos levado a morte celular.

Na escolha de um composto antimicrobiano para uso industrial deve-se considerar, além das características físicas, valor e o tempo de contato, haja vista que, as etapas do processo são rigorosamente cronometradas para que se possa manter a qualidade bem como o custo de produção.

Ressalta-se que, o urucum e o ácido fosfórico são compostos utilizados no processo de produção de salsichas, desta forma, podemos inferir que a etapa de tingimento pode auxiliar no controle da multiplicação de *L. monocytogenes* no produto.

Já o Biomax D[®] apresentou atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* em todas concentrações e tempos de contato avaliados, demonstrando seu potencial no controle deste micro-organismo.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios e o desvio padrão das contagens de *L. monocytogenes* em salsichas submetidas aos tratamentos com urucum e ácido fosfórico.

Observa-se na Tabela 2 que quando a concentração de *L. monocytogenes* na salsicha estava em $2,34 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, o urucum e ácido fosfórico eliminou o micro-organismo. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nas contagens de *L. monocytogenes* quando a salsicha foi tratada com urucum e ácido fosfórico na forma individualizada ou em conjunta. Com este resultado podemos inferir que, o corante de urucum e o ácido fosfórico, compostos utilizados na etapa de tingimento da salsicha, podem contribuir no controle de *L. monocytogenes* do produto. Já quando os compostos foram testados individualmente ou associados nas concentrações de $4,19$ e $5,19 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ de *L. monocytogenes*, houve redução de $2,69$ e $1,35 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ do micro-organismo nas salsichas, respectivamente. Comportamento semelhante foi relatado por Castro (2002), onde a atividade antilisterial da nisina (200 ppm) e do ácido fosfórico (0,1 %) foi identificada até a concentração de $3,0 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de *L. monocytogenes*.

Tabela 2 - Contagens ($\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$) de *L. monocytogenes* em salsichas submetidas aos tratamentos com urucum e ácido fosfórico.

Tratamento	Contagem de <i>L. monocytogenes</i> ($\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$)		
C- Controle Positivo (<i>L. monocytogenes</i>)	$2,34 \pm 0,06^{aD}$	$4,19 \pm 0,02^{aC}$	$5,19 \pm 0,03^{aA}$
1 - Urucum (2,0%)	$1,00 \pm 0,00^{bC}$	$2,24 \pm 0,34^{cB}$	$3,66 \pm 0,00^{cA}$
2 - Ácido fosfórico (1,5%)	$1,00 \pm 0,00^{bA}$	$1,50 \pm 0,71^{bA}$	$4,23 \pm 0,04^{bA}$
3 - Urucum (2,0%) + Ácido fosfórico (1,5%)	$1,00 \pm 0,00^{bA}$	$1,50 \pm 1,49^{bA}$	$3,84 \pm 0,004^{bcA}$

^{AB} Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre as concentrações. ^{ab} Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Letras iguais não diferem entre si significativamente. Em amarelo acho que não está certa a análise estatística, coluna

O corante de urucum apresentou atividade antimicrobiana semelhante quando aplicado individualmente na salsicha contendo $4,19$ e $5,19 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de *L. monocytogenes* bem como em

conjunto com o ácido fosfórico. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as contagens de *L. monocytogenes* dos tratamentos da salsicha com urucum e urucum + ácido fosfórico.

Os valores médios e o desvio padrão das contagens de *L. monocytogenes* em salsichas submetidas aos tratamentos com urucum, ácido fosfórico e Biomax D[®] nos tempos zero (logo após o preparo), 5 e 10 dias de armazenamento a 4 °C, podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3 –Contagens de *L. monocytogenes* (\log_{10} UFC.g⁻¹) em salsichas tratadas com urucum, ácido fosfórico e Biomax D[®] individualmente ou combina durante 10 dias de armazenamento a 4 °C.

Tratamento	Contagem de <i>L. monocytogenes</i> (\log_{10} UFC.g ⁻¹)		
	Tempo (dias)		
	0	5	10
Controle Positivo - <i>L. monocytogenes</i>	2,59 ^{aC} ±0,16	4,18 ^{aB} ±0,04	5,34 ^{aA} ±0,04
1 - Urucum (2,0%)	1,00 ^{bB} ±0,00	2,39 ^{bAB} ±0,55	2,66 ^{bA} ±0,26
2 - Ácido fosfórico (1,5%)	1,00 ^{bA} ±0,00	1,00 ^{cA} ±0,00	2,57 ^{bA} ±0,81
3 – Urucum (2,0%) + Ácido fosfórico (1,5%)	1,00 ^{bB} ±0,00	1,00 ^{cB} ±0,00	2,15 ^{bA} ±0,21
Controle Positivo - <i>L. monocytogenes</i>	1,50 ^{aA} ±0,71	2,04 ^{aA} ±0,06	3,47 ^{aA} ±0,50
4 - Biomax D [®] (5,0%)	1,00 ^{aA} ±0,00	1,00 ^{bA} ±0,00	1,00 ^{bA} ±0,00
5 - Biomax D [®] (5,0%) + Urucum (2,0%)	1,00 ^{aA} ±0,00	1,00 ^{bA} ±0,00	1,00 ^{bA} ±0,00
6 - Biomax D [®] + Ácido fosfórico (1,5%)	1,00 ^{aA} ±0,71	1,00 ^{bA} ±0,00	1,50 ^{bA} ±0,71
7 - Biomax D [®] (5,0%) + Urucum (2,0%) + Ácido fosfórico (1,5%)	1,00 ^{aA} ±0,00	1,00 ^{bA} ±0,00	1,00 ^{bA} ±0,00

^{AB} Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento. ^{ab} Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos. Letras iguais não diferem entre si significativamente.

Observa-se, que a *L. monocytogenes* se adaptou a salsicha e multiplicou durante os 10 dias de armazenamento 4 °C. Houve aumento de 2,77 \log UFC.g⁻¹ nas contagens de *L. monocytogenes* nas salsichas que não foram tratadas com os compostos antimicrobianos. Este resultado era esperado, haja vista que, a *L. monocytogenes* é um micro-organismo psicotrófico, ou seja, desenvolve em temperatura de refrigeração.

Resultado semelhante foi relatado por Zdanski (2011), onde a *L. monocytogenes* se adaptou a salsicha e aumentou 2,3 \log_{10} UFC.g⁻¹ em 14 dias de armazenamentos a 5 °C.

É importante ressaltar, que concentrações de < 10 *L. monocytogenes* foram relatadas como responsáveis por surtos e o desenvolvimento da listeriose (Zdanski, 2011).

Observa-se na tabela 3 que o urucum, ácido fosfórico e o Biomax D[®] quando aplicado individual ou em combinação, a ação antimicrobiana foi imediata dos compostos contra *L. monocytogenes*. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as contagens de *L. monocytogenes* no tempo zero e o 10° dia de armazenamento, das salsichas submetidas à imersão em urucum e ácido fosfórico.

No quinto dia de armazenamento (Tabela 3), a *L. monocytogenes* multiplicou nas salsichas tratadas com urucum. No entanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as contagens de *L. monocytogenes* em salsichas submetidas ao urucum e às salsichas sem tratamento. Demonstrando que, o corante de urucum possui atividade antimicrobiana contra a *L. monocytogenes*, no entanto, não elimina o micro-organismo.

Quando as salsichas foram tratadas com ácido fosfórico e a combinação urucum + ácido fosfórico não foi identificado *L. monocytogenes* até os 5 dias de armazenamento. No entanto, em 10 dias de armazenamento das salsichas, as contagens de *L. monocytogenes* variaram entre 2,75 e 2,15 log UFC.g⁻¹, respectivamente. Com isto, podemos inferir que, o ácido fosfórico e a combinação urucum + ácido fosfórico possuem ação bacteriostático, permitindo que as células injuriadas de *L. monocytogenes* recuperassem nas salsichas durante o armazenamento. Este comportamento foi descrito por Bedie *et al.* (2001), onde avaliaram a atividade antimicrobiana do acetato de sódio e do diacetato de sódio em salsichas com 10³ e 10⁴ UFC.g⁻¹ de *L. monocytogenes* e estocadas por 120 dias a 4 °C. O acetato de sódio e o diacetato de sódio inibiram a multiplicação de *L. monocytogenes* até o 50º dia de armazenamento, após houve aumento de mais de 1 log₁₀ UFC.g⁻¹ do micro-organismo.

Quando as salsichas foram tratadas com Biomax D[®] na forma individual ou combina não houve a multiplicação de *L. monocytogenes* durante o armazenamento por 10 dias a 4 °C (Tabela 3).

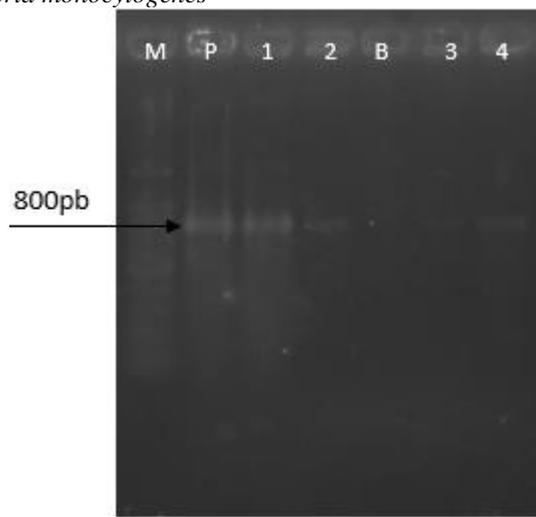
Este resultado demonstra, que o Biomax D[®] possui atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, eliminando o micro-organismo em salsicha.

A atividade antimicrobiana do extrato de pomelo, composto presente no Biomax D[®], também foi relatada por Gerhardt *et al.* (2012), onde avaliaram diversos extratos de frutas cítricas, inclusive extrato de pomelo, e verificaram atividade antimicrobiana destes extratos contra as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Entretanto, nenhum estudo científico no Brasil avaliou o efeito do Biomax D[®] como antimicrobiano em embutidos cárneos, como a salsicha. Neste estudo observou-se que o Biomax D[®] foi eficaz no controle de *L. monocytogenes* durante o tempo de armazenamento, apresentando potencial de utilização como antimicrobiano natural para uso em salsichas.

Para confirmar a identidade dos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsichas tratadas com urucum, ácido fosfórico e Biomax D[®], os DNAs foram extraídos e submetidos a PCR. Todos os isolados amplificaram na região de 800 pb, confirmando a espécie de *L. monocytogenes* na salsicha.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 2% com produtos da PCR para identificação da espécie *Listeria monocytogenes*. M marcador de peso molecular: Ladder 100 pb; P controle positivo: *Listeria monocytogenes* Scott A (800 pb); os números correspondem aos isolados de *Listeria monocytogenes*



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A salsicha é um embutido cárneo em que a *L. monocytogenes* pode se multiplicar e atingir elevadas contagens celulares em temperatura de refrigeração. O corante de urucum e o ácido fosfórico, utilizados na etapa de tingimento da salsicha, podem contribuir para o controle *L. monocytogenes*. O Biomax D[®] possui atividade antilisteria em embutido cárneo, demonstrando potencial de utilização como antimicrobiano natural em salsicha.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual da carne suína brasileira. 2014/2015. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf>. Acesso em: 13 de mar. de 2017.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual da carne suína brasileira. 2020. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf>. Acesso em: 20-de set. de 2020.

BEDIE, G. K.; SAMELIS, J.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G. C. Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4 °C in vacuum-packages. *J. Food Protect*, v. 64, p. 1949-1955, 2001.

BRASIL (2000). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – MAPA/DAS. Instrução Normativa Nº 4 de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de identidade e Qualidade de Salsicha. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 de abr. de 2000. Anexo IV, seção 1, p. 37.

CASTRO, A. P. Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas, psicotróficas, bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas a tratamento com nisina. 2002. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

ESPINA, L., GARCIA-GONZALO, D., LAGLAOUI, A., MACKKEY, B.M., PAGAN, R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *Int. J. Food Microbiol*, v.161, p. 23–30, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.015>

FADDA, S.; LÓPEZ, C.; VIGNOLO, G. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science*, v. 86, n. 1, p. 66–79, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.023>

GERHARDT, C.; WIEST, J.M; GIROLOMETTO, G.; MAGNÓLIA, M.A.A.S.; WESCHENFELDER, S. Aproveitamento da casca de citros na perspectiva de alimentos: prospecção da atividade antibacteriana. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, p. 11-17, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000033>

JOSEWIN, S.W., KIM, M.J., YUK, H.G. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on cantaloupe rinds by blue light emitting diodes (LEDs). *Food Microbiol*. V. 76, p. 219–225, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.012>

MAJOLO, C.; CARVALHO, H. H.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana “in vitro” de diferentes acessos de urucum (*Bixa Orellana*) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. *B. CEPPA*, v. 31, n.1, p. 115-124, 2013. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v31i1.32708>

MORAIS, M. F. Inibição de *Listeria Monocytogenes* em Salsicha por *Leuconostoc Mesenteroides* Isolada de Grãos De Kefir. 2015. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2015.

PROZYN (2013) - Biomax D: Substituição Natural aos Conservantes; Guia do fabricante.

RAMOS, B.; BRANDÃO, T. R.S.; TEIXEIRA, P.; SILVA, C. L.M. Biopreservation approaches to reduce *Listeria monocytogenes* in fresh Vegetables. *Food Microbiology*, v. 85, p. 103282, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103282>

RODRIGUES, C. S.; SÁ, C. V. G. C.; MELO, C.B. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciência Rural*, v. 47, n. 2, p. 1–8, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160721>

SHEN, Q., PANDARE, P., SONI, K.A., NANNAPANENI, R., MAHMOUD, B.S.M., HARMA, C.S. Influence of temperature on alkali stress adaptation in *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v. 62, p. 74–80, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.005>

SHEN, Q., SONI, K.A., NANNAPANENI, R. Stability of sublethal acid stress adaptation and induced cross protection against lauric arginate in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol*, v. 203, p. 49–54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.027>

TAHAM, T.; CABRAL, F. A.; BARROZO, M. A. S. (2015) Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *J. Supercrit Fluids*, v. 100, p. 175-183, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.02.006>

WANG, K.; YE, K.P.; ZHU, Y.P.; HUANG, Y.; WANG, G.Y.; WANG, H.H.; Zhou, G.H. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from chilled pork in Nanjing, China. *LWT - Food Sci Tech*, v. 64, n. 2, 905-910, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.015>

ZDANSKI, S. F. R. Ácidos Orgânicos e seus sais e nisina no controle de bactérias lácticas, aeróbias mesófilas e *Listeria monocytogenes* em salsichas. 2011. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011.