

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO USO DO NITRATO E NITRITO NA INIBIÇÃO  
DE *C. perfringens* TIPO A EM LINGUIÇA BOVINA CURADA**

**Melissa Amin**

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
OUTUBRO DE 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO USO DO NITRATO E NITRITO NA INIBIÇÃO  
DE *C. perfringens* TIPO A EM LINGUIÇA BOVINA CURADA**

**Melissa Amin**

Orientador: Prof. Dr. Jair Vicente de Oliveira

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
2005

O que sabemos é uma gota.  
O que ignoramos é um oceano.

Isaac Newton  
(1643-1727)

As pessoas que jamais deixaram que me incentivar, por menor do que fosse a contribuição. Para as pessoas que sempre souberam que a única forma de conhecer é descobrir, e que fazer descobrir é a única forma de ensinar.

## AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho só foi possível devido à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto a minha gratidão a todas elas e de forma particular:

aos técnicos de laboratório Osmar ferreira de Andrade, Darli Castro Costa, Márcio Olívio Figueiredo Vargas, Creuza de Matos, Lucia Kazue Nakahata Medrado, Sidnei Rocha Ferreira, do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública;

aos professores Maria Isabel Lima Ramos, Manoel Mendes Ramos Filho, Priscila Aiko Hiane, Flodoaldo Alves de Alencar, Hugo Souza Paes de Barros, Maria Tereza Duenhas Monreal, do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública;

aos funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública, em especial, Neide Aparecida Pereira Vieira, Nayara Gomes;

a Ivano de Filippis da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS);

ao professor Dr. Jorge Antonio Ferreira de Lara do Mestrado em Ciência Animal;

a Marilete Otano Peixoto Ferencz do Mestrado em Ciência Animal;

ao professor Dr. Alfredo Sampaio Carrijo do Departamento de Produção Animal;

ao meu orientador Prof. Dr. Jair Vicente de Oliveira, pela dedicação, ensinamentos e oportunidades, que me fizeram crescer na minha vida profissional;

aos meus familiares e amigos, dos quais recebi todo o apoio para alcançar os meus objetivos.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Conversão do nitrato de sódio a nitrito de sódio.....	9
Figura 2. <i>Clostridium perfringens</i> .....	11

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Fatores limitantes do crescimento do microrganismo <i>Clostridium perfringens</i> .....	12
Quadro 2. Características da gastroenterite causada pelo microrganismo <i>Clostridiumperfringens</i> .....	13

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Formulação das lingüiças.....	28
Tabela 2. Número de colônias de bactérias em placas obtidas das amostras de lingüiça em diferentes dias.....	30
Tabela 3. Níveis de nitrato e nitrito (ppm) determinados nas amostras de lingüiça em diferentes dias.....	30

## SUMÁRIO

	“Página”
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Lingüiça .....	2
2.2. Aditivos .....	5
2.3. Nitrato e Nitrito .....	6
2.4. <i>Clostridium perfringens</i> tipo A .....	11
2.5. Intoxicação alimentar por <i>Clostridium perfringens</i> .....	13
3. REFERÊNCIAS.....	17
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	24
Resumo.....	24
Abstract.....	25
Introdução.....	26
Materiais e Métodos.....	27
Resultados e Discussão.....	29
Conclusão.....	33
Referências .....	33

## 1. INTRODUÇÃO

Aos alimentos preparados industrialmente são adicionados aditivos que podem proporcionar uma variedade de subprodutos e aumentar o tempo de vida útil. A criação de novos produtos possibilita escolhas alternativas para o mercado consumidor e uma possível adicional fonte de renda aos pequenos produtores.

Um dos produtos de maior comercialização pela facilidade do processo de elaboração e preço acessível de mercado, é a lingüiça. Segundo Fernandez et. al. (2005), muitas vezes esse embutido é produzido irregularmente em nível doméstico, sem autorização dos órgãos competentes utilizando aditivos de forma inadequada. Entre os aditivos utilizados como conservantes na lingüiça, estão os nitratos e nitritos, os quais são adicionados com objetivos de conservar as características sensoriais, como a coloração avermelhada ou rósea que é resultado da reação entre a mioglobina e o óxido nítrico (proveniente da redução do nitrito), além de impedir alterações provocadas por microrganismos, principalmente os clostrídios (O'LEARY & SOLBERG, 1976; GREVER & RUITER, 2001).

Das muitas espécies de clostrídios, destaca-se o *Clostridium perfringens*, responsável por intoxicações alimentares clássicas devido a produção de uma enterotoxina, capaz de interferir no transporte de água, sódio e cloretos através da mucosa intestinal causando dentre os sintomas diarreia e dores abdominais agudas (BRYNESTAD & GRANUM, 2002).

Contudo, o uso de aditivos é um tema controvertido, com alegações de que eles podem ser tóxicos, além de serem precursores das nitrosaminas, substâncias cancerígenas (BINSTOK et. al., 1996).

O emprego de aditivos deve ser justificado sempre que proporcionar vantagens de ordem tecnológica e não para substituir precauções higiênicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Lingüiça

Desde a remota antigüidade o homem vem fabricando diferentes tipos de lingüiça, na busca de conservar a carne e fornecer um produto à altura das exigências do consumidor (TERRA, 1998).

Entende-se por lingüiça, o produto cárneo industrializado elaborado a partir de carnes de animais de açougue, adicionado ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutidos em envoltório natural ou artificial e submetido a processo tecnológico adequado. Pode ter sua classificação variável de acordo com a composição da matéria-prima e a tecnologia utilizada na fabricação (BRASIL, 2000a).

A lingüiça é classificada como produto curado e embutido, de acordo com a legislação, se enquadra na subcategoria 8.2.1.1, fazendo parte da Categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos (BRASIL, 1998b). Os embutidos de carne, em seu conjunto, ocupam posição privilegiada nas estatísticas brasileiras, correspondente a 45% em relação às demais carnes processadas (PARDI et al., 1995).

No Brasil, a lingüiça é um dos produtos cárneos mais fabricados (250.000 toneladas em 1994), provavelmente porque sua elaboração, além de não exigir tecnologia sofisticada, utiliza poucos equipamentos de baixo custo (TERRA, 1998).

Para Fernandez et al. (2005), as lingüiças são comercializadas em grande escala por se tratar de um produto de valor comercial acessível a todos os setores da sociedade sendo facilmente encontrados em supermercados, açougues, mercearias e feiras livres.

Melo Filho et al. (2004), afirmam que o preço acessível de algumas marcas, a praticidade do preparo e o valor protéico dos produtos embutidos, contribuem para a redução do “déficit” nutricional, principalmente da população de baixa renda. É importante considerar os principais diferenciadores entre os fabricantes: a qualidade, o preço e a apresentação do produto. Observa-se a comercialização de produtos embutidos de marcas desconhecidas, elaborados artesanalmente, sem qualquer orientação ou fiscalização, por

parte dos órgãos competentes, oferecidos indiscriminadamente, expondo os consumidores aos riscos inerentes à ingestão de alimentos processados em condições higiênicas precárias.

Por outro lado, devido ao grande mercado consumidor, tem-se também cada vez mais a exigência de produtos de qualidade, que segundo Soares et al. (2003), é um fator decisivo para que a indústria de alimentos busque continuamente a adaptação e desenvolvimento de novas formulações que visem além da melhoria na qualidade, principalmente, à segurança dos produtos alimentares. As novas formulações e os processos para obtenção de alimentos seguros tornam-se possíveis por intermédio do advento de novos ingredientes e aditivos.

Na fabricação da lingüiça, os principais ingredientes utilizados são a carne e a gordura animal (toucinho), sendo o sal, açúcar, nitrato e nitrito, os aditivos adicionados.

Roça (2005), define o processo pelo qual são utilizados os aditivos citados acima e condimentos, como cura, conferindo a melhoria das características sensoriais desejáveis na lingüiça, como sabor, aroma e cor (coloração vermelha ou rósea mais atraente), além da conservação da carne por um período de tempo mais longo. Segundo esse mesmo autor, em produtos de salsicharia, os ingredientes de cura são incorporados durante os processos de mistura e moagem. São adicionados em forma seca ou como solução concentrada e são distribuídos uniformemente por todo produto durante a trituração e preparo da massa. Essa técnica é conhecida como cura direta.

Para Hwang (2001), o processo de cura impede o crescimento de bactérias patogênicas responsáveis por graves doenças, além de melhorar a segurança do produto.

Conforme Cheftel & Cheftel (1999), o sal de cura se caracteriza por um conteúdo de sal relativamente elevado, em torno de 4% ou mais, pela presença de nitritos, e nitratos em menor quantidade.

O sal (cloreto de sódio - NaCl) atua realçando o sabor, e contribuindo igualmente para o desenvolvimento da cor. Em altas concentrações, pode atuar como agente conservante (BRASIL, 1998a).

De acordo com Hughes (1994), o sal é um conservante muito antigo, utilizado há mais de 5.000 anos. Através de décadas, a carne tem sido preservada com o emprego dele, e prevenindo em certas concentrações, o crescimento de alguns microrganismos responsáveis

pela deterioração da carne. O mecanismo de prevenção do crescimento bacteriano inclui também o seu efeito de redução da água disponível na carne (EPLEY et al. 1992). Conseqüentemente, ocorre o aumento da pressão osmótica. A solução de sal pode ser tóxica ao microrganismo dependendo da sua concentração e da tolerância que o microrganismo tem pelo sal. Entretanto, as concentrações empregadas (2-3%) nas fórmulas de cura em carnes, não exercem ação conservadora, sendo sua principal função de agente aromatizante (ROÇA, 2005).

Prändl et al. (1994), descrevem que a concentração de sal limitante para o crescimento do microrganismo *Clostridium perfringens* é de 8%. Discordando de Jay (1994), que afirma que a inibição do crescimento desse microrganismo é em torno de 5% de cloreto de sódio. Para Silva (2000), o microrganismo pode crescer na presença de até 2% de NaCl. Concentrações em torno de 10% de NaCl são necessárias para inibir a multiplicação das cepas de *C. perfringens*, segundo Leitão (1984).

O açúcar é um aditivo adicionado com a função de dar sabor e a de servir como fonte de energia para as bactérias responsáveis pela redução do nitrato a nitrito, na primeira etapa do processo de formação de cor na cura de carnes e posterior desenvolvimento das bactérias acidoláticas responsáveis pelo abaixamento do pH no produto, devido a transformação em ácido láctico (HERSOM & HULLAND, 1985; FEHLHABER & JANETSCHKE, 1995). As concentrações utilizadas em cura (0,5 a 1,0%), não chegam a ter alguma ação conservadora.

O modo de ação do açúcar e do sal são similares, pois quando a célula microbiana é colocada numa concentração hipertônica (por exemplo, a 5%), a quantidade de água é maior dentro da célula. Portanto, a água tende a sair numa velocidade maior do que entra, ocasionando a plasmólise, que resulta na inibição do crescimento até a sua morte. Tal fato ocorre também na estrutura da carne, ocasionando a desidratação (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Os aditivos considerados como ingredientes principais da cura, e que tem sido comumente utilizados em indústria alimentícias, principalmente em produtos cárneos, são nitrato e nitrito (HAYES, 1993; PINHO et al., 1998).

## 2.2. Aditivos

Em relação às definições de ingredientes e aditivos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), por meio de Brasil (2000b), definiu ingrediente como “qualquer substância, empregada na fabricação ou preparação de um alimento e que permanece no produto final, ainda que de forma modificada” e aditivo alimentar como “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento”.

Conforme Silva (2000), o conceito de aditivo alimentar é bastante variável de um país para outro. Uma determinada substância poderá ser utilizada como aditivo por um país e ter seu uso proibido em outro. Devido a esses problemas ocorridos, principalmente no comércio de exportação, verificou-se a necessidade da unificação do conceito de aditivos para alimentos.

Nacionalmente, existe uma legislação específica, que atribui a função de aditivos e seus limites máximos permitidos (BRASIL, 1998a).

Cunha et al. (2003), ressaltam além do emprego dos aditivos serem limitados por legislações específicas, são apoiados em critérios restritivos que levam em consideração recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS). No Brasil e em inúmeros países, os aditivos alimentares são usados amplamente, exercendo diferentes funções no produto final.

O uso de aditivos com vantagem para o consumidor pode ser tecnologicamente justificado, desde que sirva para o aumento do valor nutritivo do alimento, além de sua conservação ou estabilidade, tornando o alimento mais atrativo ao consumidor mas sem levá-lo a engano (GAVA 1999).

### 2.3. Nitrato e Nitrito

Silva (2000), define os nitritos como conservantes inorgânicos que inibem ou retardam a multiplicação dos microrganismos. O nitrito de sódio é um sal de um ácido relativamente fraco e de uma base forte. É uma substância cristalina, muito solúvel em água (ROÇA, 2005).

Nitrito de sódio e nitrato de sódio possuem limites máximos para uso de 0,015 e 0,03 g/100g, respectivamente, sendo que a quantidade residual máxima é expressa como nitrito de sódio. A mescla de aditivos com igual função pode ser utilizada, desde que a soma de todos os limites não seja superior ao limite máximo de nenhum deles (BRASIL, 1998a).

Segundo Heaton et al. (2000), nos Estados Unidos, o nitrito de sódio é permitido em níveis de até 156ppm em carnes curadas. Na França, seu emprego está autorizado desde 1964, mas unicamente na forma de sal nitrado (0,6%) com o objetivo de evitar acidentes no momento da manipulação (GIRARD, 1991).

Öztekin et al. (2002), concordam que o nitrato e o nitrito são amplamente utilizados como conservantes em produtos cárneos.

Pardi et al. (1995), relatam que pesquisas têm demonstrado que o principal atributo do nitrito é garantir a estabilidade microbiológica das carnes curadas, inibindo o desenvolvimento de diversas bactérias patogênicas, particularmente o *Clostridium botulinum*, concordando com International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1980) e Hughes (1994).

Azanza & Rustia (2004), relatam que a principal finalidade do nitrato e do nitrito são como agentes antimicrobianos e não como um aditivo para melhorias na cor, textura e flavor.

O código de rotulagem para o nitrato e o nitrito são PVII e PVIII, respectivamente (FRANCO & LANDGRAF, 1996), sendo o uso da letra P indicativo do código de conservantes.

É reconhecido que concentrações comercialmente aceitáveis de nitrito de sódio podem interferir no crescimento das células bacterianas, sendo um obstáculo adicional para os microrganismos (CASTELLANI & NIVEN, 1955).

O nitrato atua como fonte de nitrito, permitindo que a carne mantenha um nível eficaz para a sua conservação, conforme Frazier & Westhoff (1993) e Silva (2000), sendo a quantidade de nitrito formada dificilmente determinada. Azanza & Rustia (2004), relatam que a utilização do nitrato resulta em uma cura da carne mais lenta e menos previsível.

Para Jay (1994), além de seu efeito antimicrobiano contra o *Clostridium botulinum*, o nitrito também se mostra eficaz em relação a outros clostrídios, como o *Clostridium perfringens*. Este é um microrganismo utilizado com frequência em estudos laboratoriais para determinar o possível efeito antibotulínico.

MANHOSO & RUDGE (1999) concordam com a afirmação acima, sendo que a principal justificativa para o emprego do nitrito na elaboração de produtos cárneos se baseia no fato de prevenir o aparecimento de formas vegetativas e impedindo tanto a germinação quanto a multiplicação dos esporos de *Clostridium sp.*

O nitrito de sódio tem sido reconhecido como inibidor do crescimento de esporos de clostrídios em bacon e outras carnes curadas (CHRISTIANSEN et al., 1973; CHRISTIANSEN et al., 1974). Concordando com Hayes (1993), que afirma como sendo a principal função prevenir a germinação e crescimento dos esporos.

O nitrito é uma molécula reativa a qual pode modificar diversos componentes celulares, entretanto as modificações que realmente contribuem para a ação conservante dele não são tão simples de serem compreendidas (BUCHMAN & HANSEN, 1987).

De acordo com os Elementos de Apoio em Boas Práticas e Sistema APPCC (2001), a ação conservadora do nitrito é devido a sua combinação com as enzimas respiratórias das bactérias anaeróbicas, inativando-as.

Carpenter et al. (1987), analisando os efeitos do nitrito sobre o microrganismo *C. botulinum in vivo e in vitro*, concluíram que os efeitos inibitórios foram, ao menos, em parte da inativação da piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFO) e da ferredoxina. Esses autores concluíram que a inibição foi resultado da destruição dos centros de ferro-enxofre das enzimas, devido à formação de complexos ferro-enxofre-óxido nítrico (Fe-S-NO),

concordando com a teoria proposta anos antes por Tompkin et al. (1979). Os sítios de ferro não heme são caracterizados pela presença de átomos de enxofre e é de interesse que complexos Fe-S-NO estejam supostamente ligados em aumentar a atividade do nitrito em sistemas aquecidos, particularmente na inibição do *Clostridium* (MORAN et al., 1975).

Jay (1994) e Franco & Landgraf (1996), reafirmam que o nitrito inibe os clostrídios ao interferir com enzimas que apresentam ferro e enxofre em sua estrutura, impedindo desse modo a síntese de ATP (adenosina trifosfato) a partir do piruvato (essas enzimas atuam sobre o transporte de elétrons, na quebra do piruvato, originando ATP, H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>). As bactérias lácticas são resistente devido à falta de ferredoxina.

McMindes & Siedler (1988) citados por Nunes (2003), investigando os efeitos do nitrito e do óxido nítrico na enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase no *C. perfringens*, verificaram que as concentrações de óxido nítrico inibiram a PFO.

Além das finalidades da utilização de nitrato de sódio e nitrito de sódio como bacteriostáticos em meio ácido, inibindo alguns microrganismos deteriorantes e produtores de toxinfecção alimentar, o nitrito como um agente estabilizante da cor vermelha, conferindo o flavor (sabor e aroma), textura (melhoria das características sensoriais), que são propriedades apreciadas pelos consumidores (ROÇA, 2005; PINHO et al., 1998; FRANCO & LANDGRAF, 1996; PARDI et al., 1995; MANHOSO & RUDGE, 1999). Pardi et al (1995) ainda afirmam que o fenômeno da fixação da cor, é bastante complexo e não inteiramente esclarecido, mas exclui a hemoglobina.

Zanardi et al. (2002a), afirmam que o nitrato é reduzido a nitrito em carnes, por bactérias que normalmente ocorrem na microbiota da carne, e o nitrito é reduzido a óxido nítrico (NO), que é o componente que vai reagir com a mioglobina (principal pigmento da carne), para formar a coloração típica dos produtos curados (nitrosomioglobina) sem ação do calor, gerando uma cor mais avermelhada. O nitrosohemocromo é o pigmento final, róseo, que devem ter todas as carnes submetidas ao aquecimento (desnaturação da parte protéica, mas a estrutura hemo unida ao óxido nítrico fica intacta), sendo mais estável ao calor, porém instável à luz e oxidações.

A reação da mioglobina com o nitrito sob condições de redução, estabelecida em produtos curados, promove estabilidade a nitrosomioglobina, na qual o óxido nítrico é

ligado a porção heme e torna-o indisponível para a oxidação lipídica (ZANARDI et al., 2002b). Considera-se também como efeito, o retardo na rancidez das carnes curadas (FORREST et al., 1979).

A conversão do nitrato de sódio a nitrito de sódio pode ser esquematizada da seguinte maneira:

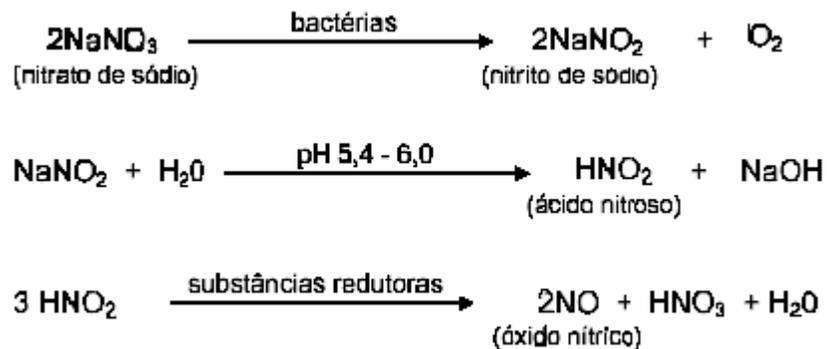


Figura 1. Conversão do nitrato de sódio a nitrito de sódio de acordo com Roça (2005).

De acordo com Melo Filho et al. (2004), apesar dos aditivos contribuírem, de forma significativa, para a conservação de embutidos, sua utilização deve ser devidamente inspecionada, pois há riscos associados ao emprego indiscriminado desses aditivos.

Segundo Forest et al. (1979), uma dose de nitrito que supere 15 a 20 mg por quilo de peso corporal pode ser letal; todavia o nível máximo permitido nos alimentos curados situe-se entre 20 a 40 vezes abaixo da dose letal.

Menos de 10% do nitrito permanece no produto após sete dias. Desta forma, a quantidade de nitrito adquirida por uma pessoa consumindo carnes curadas é muito menor que a quantidade adicionada (PARDI et al., 1995).

Os autores Manhoso & Rudge (1999), Pinho et al. (1998), enfatizam que o emprego incorreto ou indiscriminado do nitrito no processamento das carnes apresenta riscos toxicológicos com efeitos seriamente indesejáveis à saúde dos consumidores, podendo levar à metemoglobinemia e apresentar efeitos carcinogênicos, pois é um importante

precursor de nitrosaminas. O nitrato possui menor efeito tóxico, representando um perigo quando ingerido em grandes quantidades ou se convertidos a nitrito.

Silva (2000), acrescenta que a metemoglobinemia ocorre após a ingestão do alimento, que contem excessivas quantidades de nitrito. Essas doses elevadas podem ser transferidas para a corrente sangüínea e converter a hemoglobina em metahemoglobina que não faz o transporte do oxigênio. A concentração de metahemoglobina no sangue é de aproximadamente 1,0% contra 99% de hemoglobina. Se a concentração de metahemoglobina no sangue for maior do que 20%, o transporte de oxigênio fica prejudicado dificultando a respiração e provocando a palidez no indivíduo. Teores acima de 70% podem levar o indivíduo a morte, principalmente crianças, o que justifica a proibição do uso do nitrito em alimentos infantis.

Para esse mesmo autor, pode ocorrer também a formação de nitrosaminas, que são compostos formados pela reação a quente do ácido nitroso, derivado do nitrito com as aminas secundárias e terciárias. Novamente, a ingestão de doses elevadas desse composto pode provocar o surgimento de neoplasias. Algumas delas são consideradas teratogênicas. Porém nas doses permitidas em legislação, o teor de nitrito residual é muito inferior à dosagem necessária para o surgimento desses problemas.

Devido a esses efeitos tóxicos, alguns autores concluíram em suas pesquisas sobre algumas alternativas em relação a substituição parcial ou total do nitrato e nitrito. Robach et al. (1978), reportaram que uma combinação de 20ppm de nitrito e 0,2% de ácido ascórbico é pelo menos tão efetiva quanto 156ppm de nitrito, em relação ao retardo no crescimento do *Clostridium botulinum* em produtos cárneos curados de aves. Os mesmo autores também mostraram que uma combinação de 40ppm de nitrito e 0,2% de ácido ascórbico possui efeito superior a 156ppm de nitrito, em relação ao retardo no crescimento de *Clostridium sporogenes* PA 3679 e esporos de *Clostridium perfringens* em produtos cárneos curados de suínos.

Al-Shuibi & Al-Abdullah (2002), comentaram que a completa substituição do nitrito de sódio pelo sorbato de sódio não é possível, devido ao fato deste último não substituir totalmente as funções do nitrito, como o desenvolvimento da cor.

#### 2.4. *Clostridium perfringens* tipo A

Em relação as características do microrganismo *Clostridium perfringens* tipo A, Frazier & Westhoff (1993), Franco & Landgraf (1996), Silva (2000), Brynestad & Granum (2002), relatam que é um bacilo Gram-positivo bastante espesso e reto (Figura 2), com 0,6 a 2,4 $\mu$ m de largura e 1,3 a 19 $\mu$ m de comprimento, anaeróbio, esporulado e imóvel. De acordo com as toxinas que produz, as linhagens recebem uma classificação por letras maiúsculas do nosso alfabeto de A a E. O tipo A, produz toxina  $\alpha$  que tem atividade fosfolipásica (lecitinase) e é hemolítica, sendo relatado em quase todos os casos de intoxicação alimentar. Este microrganismo tem capacidade de produzir grande variedade de enzimas hidrolíticas extracelulares e é capaz de fermentar um grande número de carboidratos, com produção de gás ( $H_2$  e  $CO_2$ ) e de produtos finais ácidos. Para a sua multiplicação é indispensável a presença de vitaminas e nucleotídeos.

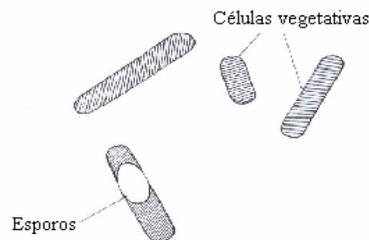


Figura 2. Bacilos de *Clostridium perfringens* segundo Hayes (1993).

Durante o processamento de vários produtos de origem animal ou vegetal, a presença do microrganismo e dos esporos de *Clostridium perfringens* deve ser presumida, pois conforme Juneja et al. (2003), essa bactéria possui ampla distribuição. Então, o tratamento térmico aplicado aos alimentos deve ser adequado para destruir os esporos ou sua germinação, e o crescimento de células vegetativas, pois assim teremos uma segurança em relação ao alimento. O tratamento térmico que possui a finalidade de destruir os microrganismos patogênicos, é considerado como ponto crítico de controle para a segurança microbiológica dos alimentos. De acordo com esses autores, a resposta ao choque térmico e a indução a termotolerância dos esporos devem ser considerados; o tempo

e a temperatura empregados devem ser adequados para destruir os esporos de *C. perfringens* que possuem termotolerância devido a uma exposição em condições estressantes de ambientes.

Para Hayes (1993), o problema do controle da temperatura para evitar as toxinfecções por *C. perfringens*, requer uma explicação: os alimentos foram submetidos ao aquecimento inadequadamente, pois as células vegetativas foram destruídas mas os esporos permaneceram viáveis. Durante o aquecimento deficiente há eliminação do oxigênio, tornando o meio anaeróbico, permitindo a germinação dos esporos quando o produto (a carne) é resfriada a 50°C.

Jay (1994) relata que na temperatura de 100°C, temos valores D de 0,31 para *Clostridium perfringens* (linhagem 3624 de origem ATCC). Para Leitão (1984), na temperatura 100°C, o valor D varia de 0,3 – 0,4 e o valor Z é equivalente a 10. O valor D é definido por GAVA (1999) como tempo de redução decimal, é o tempo em minutos a uma certa temperatura, necessário para destruir 90% dos organismos de uma população. O valor Z é definido por esse mesmo autor como o intervalo de temperatura necessário para que a curva de destruição térmica atravesse um ciclo logarítmico. Os fatores limitantes para o crescimento do microrganismo *Clostridium perfringens* serão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Fatores limitantes do crescimento do microrganismo *C. perfringens*.

Fatores limitantes para o crescimento de <i>Clostridium perfringens</i>					
	Limites de Temperatura	Temperatura ótima	Oxigênio	pH	Atividade de água
<b>Segundo Board (1988)</b>	6,5°-53°C	45°C	Anaeróbio	4,5-9,0	0,95
<b>Segundo Frazier &amp; Westhoff (1993)</b>	15°-55°C	43°-47°C	Anaeróbio	5,0-9,0	0,97
<b>Segundo Jay (1994)</b>	20°-50°C	37°-45°C	Não é anaeróbio estrito	5,5-8,0	0,95-0,97
<b>Segundo Franco &amp; Landgraf (1996)</b>	15°-51,7°C	40°-45°C	Não é anaeróbio estrito	6,0-7,0	0,95-0,97
<b>Segundo Silva (2000)</b>	15°-50°C	45°C	Anaeróbio	5,5-5,8	0,94

## 2.5. Intoxicação alimentar por *Clostridium perfringens*

A gastroenterite produzida pelo *Clostridium perfringens*, foi diagnosticada pela primeira vez nos Estados Unidos no ano de 1945 (FRAZIER & WESTHOFF, 1993), sendo suas principais características relatadas a seguir no Quadro 2.

Quadro 2. Características da gastroenterite causada pelo microrganismo *C. perfringens*

Características da gastroenterite causada pelo <i>Clostridium perfringens</i>			
	Período de Incubação	Sintomas	Fontes de Contaminação
<b>Segundo Board (1988)</b>	8-12 horas	Dor abdominal, diarreia, náusea	Trato intestinal do homem e animais
<b>Segundo Frazier &amp; Westhoff (1993)</b>	8-24 horas (12 horas a média)	Dor abdominal aguda, diarreia, gases, febre, náuseas	Solo, águas residuais, animais
<b>Segundo Jay (1994)</b>	8-12 horas	Dor abdominal aguda, febre e náuseas	Solo, poeira, água, alimentos, trato intestinal do homem e animais
<b>Segundo Franco &amp; Landgraf (1996)</b>	8-12 horas	Dor abdominal aguda, náusea, febre e náuseas	Trato intestinal do homem e muitos animais, amplamente distribuídos na natureza
<b>Segundo Silva (2000)</b>	8-12 horas	Dor abdominal e diarreia intensa	Solo, poeira, água, trato intestinal do homem e animais

Jay (1994) e Silva (2000), explicam que a causa primária dos sintomas clínicos da intoxicação alimentar devido ao *Clostridium perfringens* tipo A é a sua toxina, originada durante a esporulação das formas vegetativas no trato intestinal; específica dos esporos. Entretanto, é pouco provável que a toxina pré-formada em um alimento venha a causar intoxicação, uma vez que grandes quantidades de toxina (8 a 10mg) são necessárias para o desenvolvimento dos sintomas. Além disso, a enterotoxina não resiste ao pH ácido do trato digestivo, é termolábil (destruída a 60°C por 10 minutos), nem à ação das enzimas digestivas. A enterotoxina produzida por *C. perfringens*, após ativação pela tripsina, liga-se

aos receptores localizados no bordo em escova da célula epitelial intestinal (irreversível), interage com a membrana causando o surgimento de poros pelos quais extravasa o conteúdo celular, no momento de ruptura do esporângio, induzindo a secreção de grande quantidade de líquidos, resultando em diarreia. Há grande eliminação de sódio e potássio, e a absorção de glicose é inibida. Por se tratar de uma toxina citotóxica, a morte celular é em consequência das lesões de membrana.

Em pessoas sensíveis (crianças e idosos) provoca crises de vômito e febre, o que pode ocasionar desidratação, nos casos de diarreias graves.

O homem deve ingerir um número elevado de células vegetativas ( $5 \times 10^8$  células vegetativas) para que se produza uma dose tóxica (BOARD, 1988).

Hayes (1993) comenta que os sintomas aparecem mais frequentemente após a ingestão de alimentos contendo número elevado de células ( $10^6$  a  $10^7$  células por grama de alimento ou mais). Normalmente essa intoxicação alimentar é branda, raramente causando a morte do indivíduo.

Silva (2000) destaca que a ingestão de grandes quantidades de células, em torno de  $10^8$  células, de uma população de *C. perfringens* do tipo A é suficiente para provocar uma toxinfecção alimentar. Mossel & Garcia (1985), relatam que a essa intoxicação pode ser ocasionada após a ingestão de  $10^6$  células vegetativas ou mais.

*C. perfringens* é facilmente isolado de alimentos. Uma característica curiosa desses surtos é o número alto de indivíduos afetados. Isto deve certamente ao fato de serem causados pelo consumo de alimentos preparados em grandes quantidades e consumidos várias horas após. Neste período o microrganismo se multiplica nos alimentos quando mantidos em temperatura inadequada (estufas ou temperatura ambiente), em vez de refrigerados. Mesmo quando refrigerados, o frio pode demorar a alcançar o interior dos produtos, devido ao seu grande volume, e a multiplicação existe. Nestes casos, os esporos não são destruídos pelo calor. Alimentos à base de carne bovina têm sido relatados como sendo um dos principais alimentos causadores de intoxicação alimentar.

Jong et al. (2004), reafirmam que as intoxicações alimentares envolvendo o microrganismo *C. perfringens* envolvem erros no processamento, tanto no cozimento quanto no resfriamento do produto, que são insuficientes. Considerando a manutenção

inadequada em refrigerados domésticos, algumas situações de perigo podem ocorrer. Com isso, os alimentos devem ser aquecidos em temperaturas superiores a 60°C, limitando assim o surgimento de toxinfecções.

Conforme International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1980), as células vegetativas do *Clostridium perfringens* são sensíveis a baixas temperaturas e o armazenamento prolongado dos alimentos em temperaturas de refrigeração provavelmente resulta em destruição lenta, sendo os esporos menos afetados.

Segundo Silva (2000), se os esporos não forem destruídos durante a cocção são capazes de germinar durante o resfriamento. As condições do centro do alimento podem favorecer o crescimento explosivo e alcançar valores como  $10^5$ - $10^7$  de bactérias por grama de alimento em pouco tempo, dosagem suficiente para causar uma gastroenterite alimentar.

Os inquéritos epidemiológicos mostram, que geralmente, o alimento responsável pela intoxicação é um produto cárneo conservado por longos períodos, sem refrigeração ou sob refrigeração inadequada. Sendo a carne contaminada durante o abate, pelos microrganismos do próprio animal, pelo manipulador ou ainda pela poeira do meio ambiente. Esse mesmo autor afirma que o índice de letalidade é baixo, concordando com Jay (1994).

Frazier & Westhoff (1993), ratificam que os alimentos envolvidos são as carnes que sofreram processo de cozimento, resfriamento lento, e que após esse período foram conservadas durante algum tempo antes de serem consumidas. Como os esporos são frequentemente encontrados nos alimentos crus e são termorresistentes, é inevitável sua presença em muitos alimentos. A existência de uma grande quantidade de microrganismos da espécie *Clostridium perfringens* em um alimento que sofreu o processo de cozimento, indica uma manipulação incorreta do mesmo.

Angelotti et al. (1962), Jay (1994), concordam com os autores acima, de que a intoxicação deve-se a alimentos cárneos preparados e consumidos somente no dia seguinte ao processo e resfriados lentamente.

Frazier & Westhoff (1993) indicam como forma de prevenção o rápido resfriamento da carne cozida e dos outros alimentos, a manutenção dos alimentos em temperaturas superiores a 60°C e a higiene pessoal.

Para Brynestad & Granum (2002), a intoxicação alimentar por *Clostridium perfringens* tipo A, é uma das mais comuns no mundo industrializado (restaurantes, hospitais e asilos), que preparam grandes quantidades de comidas resfriadas lentamente ou insuficientemente reaquecidas, aumentando o número de bactérias. Os esporos sobreviventes são responsáveis pela rara, mas severa enterite necrótica, devido a produção no intestino delgado da enterotoxina (ingestão de pelo menos  $10^7$  células bacterianas), causando um colapso nas propriedades de permeabilidade da membrana. A doença é na maioria das vezes auto limitante com duração cerca de 24 horas, e o óbito pode ocorrer devido a desidratação, visto principalmente em idosos e pacientes mais novos. Devido ao caráter suave da doença e do tempo curto de duração dos sintomas, a maioria das pessoas não entra em contato com as autoridades sanitárias, e provavelmente o número de casos não é corretamente estimado. Somente adequadas rotinas de desinfecção e atenção as boas práticas de fabricação e manipulação irão eliminar esse problema.

### 3. REFERÊNCIAS

AL-SHUIBI, A.M.; AL-ABDULLAH, B.M. Substitution of nitrite by sorbate and the effect on properties of moratdella. **Meat Science**. v. 62, p. 473-478, 2002.

ANGELOTTI, R.; HALL, H.E.; FOTER, M.J.; LEWIS, K.H. Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. **Applied Microbiology**. v. 10. p.193-199, 1962.

AZANZA, M.P.V; RUSTIA, A.S. Residual nitrite levels in Philippine sweet bacon. **Food Control**. v. 15, p. 385-389, 2004.

BINSTOK, G.; CAMPOS, C.A.; GERSCHENSON, L.N. Determination of nitrites in meat systems: an improved procedure. **Meat Science**. v. 42, p. 401-405, 1996.

BOARD, R.G. **Introducción a la microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A., 1988. 271 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Aprova o Regulamento Técnico: “Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos”. Portaria nº1004, de 11 de janeiro de 1998a.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Lista os produtos comercializados no país, enquadrando-os nas Sub-categorias que fazem parte da Categoria 8 – Carnes e Produtos Cárneos. Portaria nº1002, de 11 de dezembro de 1998b.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Dispõe sobre o manual de procedimentos básicos para registro e dispensa da obrigatoriedade de registro de produtos pertinentes à área de alimentos. Resolução nº 23 de 15 de março de 2000a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de produtos de origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade das Lingüiça. Instrução Normativa n°4, de 31 de março de 2000b.

BRYNESTAD, S.; GRANUM, P.E. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74. p. 195-202, 2002.

BUCHMAN, G.W; HANSEN, J.N. Modification of membrane sulfhydryl groups in bacteriostatic action of nitrite. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.1, p. 79-82, 1987.

CARPENTER, C.E.; REDDY, D.S.; CORNFORTH, D.P. Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. **Applied Environmental Microbiology**, v.53, n.3, p. 549-552, 1987.

CASTELLANI, A.G.; NIVEN, C.F.Jr. Factors affecting the bacteriostatic action of sodium nitrite. **Applied Microbiology**, v. 3, n.4, p. 154-159, 1955.

CHEFTEL, J.C; CHEFTEL, H. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. v. 1. Zarazoga (España): Editora Acribia, 1999. 331p.

CHRISTIANSEN, L.N.; JOHNSTON, R.W.; KAUTTER; HOWARD, J.W.; AUNAN, W.J. Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *Clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned comminuted cured meat. **Applied Microbiology**, v. 25, n.3, p. 357-362, 1973.

CHRISTIANSEN, L.N.; TOMPKIN, R.B.; KAUTTER; SHAPARIS, A.B.; KUEPER, T.V.; JOHNSTON, R.W.; KAUTTER, D.A.; KOLARI, O.E. Effect of sodium nitrite on toxin production by *Clostridium botulinum* in bacon. **Applied Microbiology**, v. 27, n.4, p. 733-737, 1974.

CUNHA, F.A.; CARVALHO, T.M.J.; MENEZES, E.A.; OLIVEIRA, M.S.C.; SOUZA, P.A.S.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, A.B. Determinação de nitritos em alimentos cárneos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 35, n.1, p. 3-4, 2003.

ELEMENTOS DE APOIO EM BOAS PRÁTICAS E SISTEMA APPCC. Rio de Janeiro: SENAC/DN, 2001. 278p. (Qualidade e Segurança Alimentar). **Projeto APPCC Mesa**. Convênio CNC/CNI/SEBRAE/ANVISA.

EPLEY, R.J.; ADDIS, P.B.; WARTHESEN, J.J. Nitrite in meat. University of Minnesota. Extension Service. 1992. Disponível em: <<http://www.extension.umn.edu/distribution/nutrition/DJ0974.htm>> Acesso em: 10/05/05.

FEHLHABER, K; JANETSCHKE, P; **Higiene Veterinaria de los Alimentos**. Zarazoga (Espanña): Editora Acribia, 1995. 669 p.

FERNANDEZ, A. T.,CASTRO, F., BECKER, C. M. Avaliação do teor de nitritos e da comercialização de lingüiças clandestinas obtidas no município de Petrópolis / R.J.Escola de Medicina Veterinária. Universidade do Grande Rio. João Campos Bonisson. Disponível em: <[www.unigranrio.br/veterinaria/nitritosemlinguicas.doc](http://www.unigranrio.br/veterinaria/nitritosemlinguicas.doc)> Acesso: 10/05/2005.

FORREST, J.C.; ABERLE, E.D. & HEDRICK, H.B. et al. **Fundamentos de ciência de la carne**. Zaragoza (Espanña): Acribia, 1979. 364 p.

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

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza (Espanña): Editorial Acribia, S.A., 1993. 681 p.

GAVA, A.J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. 2ed. São Paulo: Editora Nobel, 1999. 284p.

GIRARD, J.P; **Tecnología de la carne y de los productos cárnicos**; Zaragoza (España): Editora Acribia, 1991. 300 p.

GREVER, A.B.G.; RUITER, A. Prevention of Clostridium outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite – a review. **European Food Research Technology**. v. 213. p.165-169, 2001.

HAYES, P.R. **Microbiología e higiene de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S.A., 1993. 369p.

HEATON, K.M.; CORNFORTH, D.P.; MOISEEV, I.V.; EGBERT, W.R.; CARPENTER, C.E. Minimum sodium nitrite levels for pinking of various cooked meats as related to use of direct or indirect-dried soy isolates in poultry rolls. **Meat Science**. v. 55, p.321-329, 2000.

HERSOM, A.C.; HULLAND, E.D. **Conservas Alimenticias**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S.A., 1985. 451 p.

HUGHES, C. **Guía de Aditivos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S.A., 1994. 190p.

HWANG, H.M. Safety of sodium nitrite in cured meats. Medem, Inc. Medical Library. 2001. Disponible em:  
<[http://www.medem.com/MedLB/article\\_detailb.cfm?article\\_ID=ZZZ80XEN0IC&sub\\_categoria=380](http://www.medem.com/MedLB/article_detailb.cfm?article_ID=ZZZ80XEN0IC&sub_categoria=380)> Acesso em: 01/05/2005.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecología microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, 1980. 332 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecología microbiana de los alimentos 2. Productos alimenticios**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, 1980. 657 p.

JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A., 1994. 804 p.

JONG, A.E.I.; ROMBOUTS, F.M.; BEUMER, R.R. Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. **International Journal of Food Microbiology**. v. 97, p. 71-80, 2004.

JUNEJA, V.K.; JOHN, S.N.; HUANG, L.; EBLEN, B.S. Increased thermotolerance of *Clostridium perfringens* spores following sublethal heat shock. **Food Control**. v. 14, p. 163-168, 2003.

LEITÃO, M.F.F. **Microrganismos patogênicos na carne e derivados**. In: Curso Internacional sobre Tecnologia da Carne. v.1. Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL. Campinas, p.12.1-12.24. 1984.

MANHOSO, F.F.R.; RUDGE, A.C. Aspectos microbiológicos, físico-químicos e histológicos das lingüiças tipo frescal comercializadas no município de Marília-SP. **Higiene Alimentar**, v. 13 n. 61, p. 44, 1999.

MELO FILHO, A.B., BISCONTINI, T.M.B., ANDRADE, S.A.C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n°3, p. 390-392, 2004.

MORAN, D.M.; TANNEBAUM, S.R.; ARCHER, M.C. Inhibition of *Clostridium perfringens* formed by heating sodium nitrite in a chemically defined medium. **Applied Microbiology**, v.30, n.5, p. 838-843, 1975.

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 (España): Editorial Acribia, S.A.,1985. 375p.

NUNES, T.P. Efeito da pré-cura na estabilidade microbiológica de carne mecanicamente separada e elaboração de um produto reestruturado com filés de peito de galinhas de descarte. Dissertação de Mestrado. 2003. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'. Universidade de São Paulo. Piracicaba. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-20102003-161041/publico/tatiana.pdf>> Acesso em: 01/05/2005.

O'LEARY, V.; SOLBERG, M. Effect of sodium nitrite inhibition Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on the activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.31, n.2, p. 208-212, 1976.

ÖZTEKIN, N.; NUTKU, M.S.; ERIM, F.B. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**. v.76, p.103-106, 2002.

PARDI, C..M; SANTOS, L.F; SOUZA, E.R; PARDI, H.S; **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 1ª edição. v 1. Goiânia: Editora UFG, 1995. 586 p.

PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. FIA evaluation of nitrite and nitrate contents of liver pâtés. **Food Chemistry**, v. 62, n.3, p. 359-362, 1998.

PRÄNDL, O., FISCHER, A., SCHIMIDHOFER, T., JURGGEN-SINELL, H. **Tecnologia e higiene de la carne**. Zaragoza (España): Acribia, 1994. 853 p.

ROBACH, M.C.; IVEY, F.J.; HICKEY, C.S. System for evaluating clostridial inhibition in cured meat products. **Applied Environmental Microbiology**, v.36, n.1, p. 210-211, 1978.

ROÇA, R.O. Cura de Carnes. Botucatu: Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/textos/Roca111.pdf>>. Acesso em: 08/05/2005.

SILVA, J.A. **Tópicos da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2000. 227p.

SOARES, A.L.; ODA, S.H.I.; LARA, J.A.F.; YAMASHITA, F.; IDA, E.I.; SHIMOKOMAKI, M. Ingredientes e Aditivos para carnes: segurança e inovação. **Revista Nacional da Carne**. Artigo Técnico. Edição nº317, v.22, n.259, p.18-22, 2003.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Ed. UNISINOS, 1998. 216p.

TOMPKIN, R.B.; CHRISTIANSEN, L.N.; SHAPARIS, A.B. Iron and antitoxin efficacy of nitrite. **Applied Environmental Microbiology**, v.37, n.2, p. 351-353, 1979.

ZANARDI, E.; DAZZI, G.; MADARENA, G.; CHIZZOLINI, R. Comparative study on nitrite and nitrate ions determination. **Annali Della Facolta Di Medicina Veterinaria di Parma**. v. XXII, p. 79-86, 2002a

ZANARDI, E.; DORIGONI, V.; BADIANI, A.; CHIZZOLINI, R. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. **Meat Science**. v. 61. p.7-14, 2002b.

## 4. ARTIGO CIENTÍFICO

### EFEITO DO USO DO NITRATO E NITRITO NA INIBIÇÃO DE *C. perfringens* TIPO A EM LINGUIÇA BOVINA CURADA

#### Resumo

A lingüiça, é um dos produtos cárneos embutidos mais comercializados do Brasil, devido ao processo simples de fabricação e ao seu valor comercial acessível a toda população. A produção sem critérios quanto à qualidade higiênico sanitária nas etapas de processamento representam risco para o consumidor de contrair doenças através de microrganismos ou intoxicações alimentares, pelo uso excessivo de aditivos. O presente trabalho teve como objetivo verificar a eficiência dos aditivos classificados como conservantes, nitrato e nitrito, para impedir o desenvolvimento do *Clostridium perfringens* tipo A, responsável por toxinfecção alimentar, ao longo do período de vida útil do produto. As lingüiças de carne bovina curada foram elaboradas partindo de uma massa, sendo dividida em grupo controle e grupo tratamento, inoculados com a cultura de *C. perfringens* ( $6 \times 10^3$  UFC). No grupo tratamento, houve a adição do sal de cura de formulação própria. Através de análises microbiológicas, utilizou-se o meio SFP (Ágar Shahidi Ferguson Perfringens) para quantificação da bactéria, e o método descrito por Lara et al. (1978), para a determinação dos níveis residuais de nitrato e nitrito. Os resultados demonstraram que durante o período de vida útil do produto (44 dias) não houve desenvolvimento do microrganismo nas lingüiças que receberam tratamento, mesmo em níveis baixos de nitrato e nitrito, enquanto que no grupo controle obteve-se crescimento do microrganismo, mas permanecendo dentro do limite exigido pela legislação ( $3 \times 10^3$  UFC). As quantidades de nitrato e nitrito de sódio adicionados (200ppm), indicaram um período de redução dos níveis de no mínimo quatro dias após o processo de elaboração, permanecendo então abaixo dos limites permitidos pela legislação (150ppm). De acordo com os resultados obtidos, observamos a eficiência dos conservantes nitrato e nitrito sobre o microrganismo *Clostridium perfringens* tipo A.

Palavras-chave: Nitrato, nitrito, *Clostridium perfringens*

## **Abstract**

The sausage is large-scale commercialized in Brazil due to this simple process, besides it is a product of accessible commercial value to all the sectors of the society. The commercialization without control of quality in the processing of these sausages representing risk to the consumer to contract food poisoning by microorganisms and not only for containing high levels of nitrites. The objective of this study was to verify the efficiency of nitrate and nitrite, during these levels reductions on the shelf life of the bovine cured sausage, inhibiting the development of the microorganism responsible for food poisoning, *Clostridium perfringens* type A. The sausages were elaborated from a basic mixture, which was divided in two samples (control group and treatment group) and inoculated with the culture of *C. perfringens* ( $6 \times 10^3$  UFC) . On the group which was applied the treatment, the cure salt formulated on the laboratory was added. By microbiological analysis with Agar Shahidi Ferguson Perfringens, the bacteria was quantified besides the residual levels of nitrate and nitrite were determined based on the method described by Lara et al. (1978). The results showed that on the period of shelf life (44 days), *C. perfringens* didn't growth on the treated samples even in reduced levels, while in the control group the microorganisms have growing up, but within the limits ( $3 \times 10^3$  UFC). The amount of sodium nitrate and sodium nitrite added (200ppm), shows that a period of reduction of four days before processing were necessarily to get to the limits based on the law (150ppm). On the basis of this research's findings it can be concluded that the nitrate and nitrite were efficient on the growth and germination of *C. perfringens* type A.

Keywords: Nitrate, nitrite, *Clostridium perfringens*

## Introdução

Desde a remota antigüidade o homem vem fabricando diferentes tipos de lingüiça, na busca de conservar a carne e fornecer um produto à altura das aspirações do consumidor (TERRA, 1998).

Entende-se por lingüiça, o produto cárneo industrializado elaborado a partir de carnes de animais de açougue, adicionado ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutidos em envoltório natural ou artificial e submetido a processo tecnológico adequado. Este produto tem sua classificação variável de acordo com a composição da matéria-prima e a tecnologia utilizada na fabricação (BRASIL, 2000), sendo classificada como produto curado e embutido, na subcategoria 8.2.1.1, da Portaria nº1002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (BRASIL, 1998b).

Segundo Fernandez et al. (2005), a ausência de critérios em relação à qualidade higiênico sanitária nas etapas de processamento e a falta de controle pelos órgãos de Saúde Pública representam risco para o consumidor de contrair doenças transmitidas por alimentos, ou ainda intoxicações alimentares, pelo uso excessivo de aditivos.

Os aditivos considerados como ingredientes principais da cura, e que tem sido comumente utilizados em indústria alimentícias como conservantes, principalmente em produtos cárneos, são o nitrato e o nitrito (HAYES, 1993; PINHO et al., 1998; ÖZTEKIN et al., 2002, SOARES et al., 2003).

Para Jay (1994), além de seu efeito antimicrobiano contra o *Clostridium botulinum*, o nitrito também se mostra eficaz em relação a outros clostrídios, como o *Clostridium perfringens*, e inclusive este é um microrganismo utilizado com freqüência em estudos laboratoriais para determinar o efeito antibotulínico.

Brynestad & Granum (2002), afirmam o microrganismo *C. perfringens* tipo A causa uma intoxicação alimentar muito comum no mundo industrializado (restaurantes, hospitais, asilos), que preparam grande quantidade de comidas resfriadas lentamente ou insuficientemente reaquecidas, aumentando o número de bactérias. Os esporos sobreviventes são responsáveis pela gastroenterite devido a produção no intestino delgado da enterotoxina (ingestão de pelo menos  $10^7$  células bacterianas) causando um colapso nas propriedades de permeabilidade da membrana, originando a diarréia, sendo um dos

principais sintomas. Devido ao caráter suave da doença e do tempo curto de duração dos sintomas (cerca de 24 horas), a maioria das pessoas não entra em contato com as autoridades sanitárias, e o número de casos não é corretamente estimado. Somente adequadas rotinas de desinfecção e atenção as boas práticas de fabricação e manipulação irão eliminar esse problema. De acordo com Câmara (2002), no estado de Mato Grosso do Sul, o microrganismo *C. perfringens* representou 12,8% dos surtos de toxinfecções alimentares no período de 1998 a 2001.

Na presente pesquisa foi realizada uma avaliação da eficiência do nitrato e nitrito de sódio no controle do crescimento e germinação do microrganismo *Clostridium perfringens* tipo A, relacionado a toxinfecções, em lingüiças artificialmente contaminadas.

## **Materiais e Métodos**

As amostras de lingüiças foram elaboradas no laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal, do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública (DTASP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), seguindo as Boas Práticas de Fabricação (BPF) de acordo com a legislação específica (BRASIL, 1997).

A linhagem do microrganismo *Clostridium perfringens* tipo A origem ATCC 3624, foi reidratada segundo a metodologia descrita em BRASIL (2005), utilizando o meio RCM (Reinforced Clostridium Medium). Após a reidratação, a cultura foi ativada em meio Fluido Tioglicolato.

Para a elaboração das lingüiças foi utilizada a formulação descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Formulação das lingüiças bovinas.

Formulação	Quantidade (kg)	
	Grupo Controle	Grupo Tratamento
Carne bovina (contra filé = <i>Longissimus dorsi</i> )	1,745	1,745
Toucinho	0,3079	0,3079
Sal comum (2%)	0,0349	0,0349
Nitrato (0,02%)	---	0,00035
Nitrito (0,02%)	---	0,00035
Açúcar (0,7%)	0,0122	0,0122

Observação: formulação própria

Após a obtenção da massa básica (sem adição do nitrato e nitrito), inoculou-se 1ml da cultura de *Clostridium perfringens* tipo A, contendo  $6 \times 10^3$  UFC (contagem global obtida após plaqueamento com o meio SFP), sendo então dividida em grupo controle e grupo tratamento, sendo que neste último foram adicionados os aditivos (sal, nitrato, nitrito) na forma de sal de cura. Ambos os grupos foram embutidos em tripas bovinas, embaladas a vácuo em embalagens de nylon-polietileno, contendo quatro gomos de lingüiça com aproximadamente 50g cada. As amostras foram armazenadas em recipiente plástico e mantidas em câmara fria sob temperatura de 5°C, durante 44 dias.

As lingüiças foram submetidas antes da análise microbiológica a uma temperatura de 80°C em banho-maria, sendo resfriados posteriormente (choque térmico), em temperatura ambiente.

De acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (1997), antes da abertura das embalagens, foi realizada a desinfecção com álcool 70%.

Para a retirada da unidade analítica da lingüiça, utilizaram-se pedaços menores de diversos pontos de cada gomo, até se obter 25g. A partir de 40 gomos de lingüiça de cada tratamento, foi realizada a contagem global de *C. perfringens* em duplicata, com o preparo de diluições seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) das amostras do alimento. No prosseguimento da análise, a unidade analítica foi homogeneizada em sacos estéreis, em *Stomacher* com solução salina peptonada (225ml), para permitir diluição e inoculação no meio de cultura.

Após o plaqueamento contendo o meio seletivo para *Clostridium perfringens* tipo A, Ágar Shahidi Ferguson Perfringens (SFP) elaborado por Shahidi & Ferguson (1971), suplementado com gema de ovo, incubou-se por 48 horas a 45°C, em jarras de anaerobiose.

A partir dos 40 gomos pertencentes ao grupo tratamento, foram determinadas as concentrações de nitrato e nitrito, em duplicata de 10g, baseado no método descrito por Lara et al (1978).

A análise microbiológica e a determinação dos níveis de nitrato e nitrito foram realizadas em quatro dias consecutivos, seguindo um intervalo de dois, quatro, seis, oito e dez dias, completando 44 dias no total.

## Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no presente estudo serão apresentados a seguir, nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Contagem global de colônias de *C. perfringens* tipo A obtidas das amostras de lingüiça bovina durante a vida de prateleira em diferentes tratamentos

Dia	Tratamentos	
	Grupo Controle <sup>1</sup> (UFC/25g)	Grupo Tratamento <sup>2</sup> (UFC/25g)
1	1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência
2	1,0 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
3	3,0 x 10 <sup>1</sup> 3,5 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
4	1,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência
6	3,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência
10	11,0 x 10 <sup>1</sup>	Ausência
16	10,0 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
24	3,0 x 10 <sup>1</sup> 8,0 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
34	1,0 x 10 <sup>2</sup>	Ausência
44	1,0 x 10 <sup>3</sup>	Ausência

<sup>1</sup>Sem adição do sal de cura

<sup>2</sup>Com adição do sal de cura

Tabela 3. Níveis de nitrato e nitrito (ppm) determinados nas amostras de lingüiças bovina curada inoculada com *C. perfringens* tipo A em diferentes dias da vida de prateleira

Dia	Resultados obtidos		
	Nitrato (ppm)*	Nitrito (ppm)	Nitrato + Nitrito (ppm)
1	200	200	400
2	108,79	95,27	204,06
3	108,74	136,65	245,39
4	101,32	93,64	194,96
6	70,61	52,62	123,23
10	31,56	56,41	87,97
16	13,03	43,53	56,56
24	19,25	88,70	107,95
34	15,39	73,87	89,26
44	12,41	58,16	70,57

\* Nitrato expresso em quantidade residual de nitrito

Para Silva (1997), as amostras destinadas à enumeração de *C. perfringens* não devem ser congeladas, devido à grande susceptibilidade desses microrganismos às injúrias pelo congelamento. Portanto, as amostras de lingüiça bovina curada foram submetidas ao resfriamento (5°C) durante todo o período de armazenamento.

Pelo fato do ambiente refrigerado favorecer a formação de esporos, as lingüiças foram submetidas ao choque térmico (80°C) com posterior resfriamento em temperatura ambiente, promovendo a germinação e multiplicação dos microrganismos, concordando com Mossel & Garcia (1985). Esses mesmos autores enfatizam que os esporos são ativados e germinam, multiplicando-se, posteriormente, quando a temperatura se situa abaixo de 50°C.

De acordo com a legislação Brasil (2001), a tolerância máxima permitida em amostra representativa em relação aos Clostrídios Sulfito Redutores é de  $3 \times 10^3$  UFC/g. A partir da inoculação de  $6 \times 10^3$  UFC/25g nas amostras, observamos que houve crescimento do microrganismo *Clostridium perfringens*, mas permanecendo dentro dos limites padrões exigidos pela legislação. Nas amostras que receberam o tratamento (adição do sal de cura), não foi observado crescimento do microrganismo.

Baseado nas análises das amostras preparadas no laboratório, pode-se verificar que conforme a Tabela 2, obtivemos níveis de nitrato e nitrito acima dos permitidos pela

legislação (BRASIL, 1998a), ou seja níveis acima de 150ppm em até quatro dias após a elaboração da lingüiça. Devido a esse fato, os produtos elaborados devem possuir um período de redução dos níveis até alcançarem o limite permitido em legislação específica, para posterior comercialização.

Para Frazier & Westhoff (1993), algumas linhagens são inibidas por uma concentração equivalente a 2,5% de nitrato de sódio. Observou-se que a cepa de *Clostridium perfringens* tipo A foi inibida em concentrações inferiores (0,02%) de nitrato de sódio, de acordo com os resultados obtidos nesse experimento.

De acordo com a International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSF (1980), em condições ótimas, as concentrações baixas de nitrito de sódio produzem no máximo a cor, possuindo escasso ou nenhum efeito antibacteriano, discordando da pesquisa realizada, que confirmou mesmo em níveis inferiores o efeito conservante sobre o microrganismo, além da preservação das características sensoriais, inclusive aparentemente a coloração.

Conforme Lindner (1995) e Fehlhaber & Janetschke (1995), concentrações superiores a 200ppm de nitrito de sódio tem ação bacteriostática, especialmente sobre os anaeróbios. Os resultados observados no presente estudo, confirmaram a inibição sobre microrganismo sobre o *Clostridium perfringens* tipo A em concentração abaixo de 200ppm de nitrito de sódio.

Segundo esses mesmos autores a inibição do curado sobre os microrganismos não deve ser explicada somente pela atuação do nitrito, devendo ser considerado também outros fatores como o valor de pH, atividade de água e a adição do sal comum, concordando com os autores Hersom & Hulland (1985). No trabalho realizado não houve interferência do pH e atividade de água, pois como as embalagens eram a vácuo, não houve perda de água. A concentração de sal utilizada (2%) não possui efeito antimicrobiano.

Em experimento realizado por Pérez-Rodríguez et al. (1996), os níveis de nitrato permaneceram constantes em até duas semanas de armazenamento, divergindo dos resultados obtidos, pois houve uma constante somente nos primeiros quatro dias de análises, obtendo uma queda no sexto dia. Conforme os mesmos autores, os níveis de nitrito obtiveram um declínio menos drástico no mesmo período, discordando dos

resultados obtidos da pesquisa, conforme Tabela 3. Ainda podemos destacar que após 18 dias de armazenamento, os autores verificaram que o nitrito foi rapidamente depreciado a um nível bastante baixo e constante, restando apenas 50% da quantidade adicionada de nitrato após 17 dias. No presente estudo, houve um declínio do nitrito no quarto dia, permanecendo em níveis baixos até o 44º dia de armazenamento, restando após 17 dias 21,77% de nitrito. Em relação a quantidade de nitrato, houve uma queda mais acentuada, restando somente 6,52% da quantidade total adicionada.

Pardi et al. (1995), citam que menos de 10% do nitrito permanece no produto após sete dias. Desta forma, a quantidade de nitrito adquirida por uma pessoa consumindo carnes curadas é menor que a quantidade adicionada. Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que após seis dias da elaboração da lingüiça, 26,31% de nitrito de sódio ainda permaneciam no produto.

Concordando com os autores Pinho et al. (1998), os resíduos de nitrato e nitrito são detectados em quantidades inferiores aquelas adicionadas no produto. Níveis altos e baixos foram detectados devido a dificuldade de homogeneização de pequenas quantidades dos aditivos na massa.

Hersom & Hulland (1985), afirmam que em relação a coloração característica da carne curada, uma quantidade mínima de nitrito (30ppm) é suficiente, em presença de ascorbato. Todavia, é necessário 50ppm para se obter um aroma desejado. Foi evidenciado no experimento que, quantidades menores de nitrito do que as citadas pelos autores ainda conservaram a coloração e odor característicos do produto (lingüiça).

A partir do 16º dia, as amostras que não continham o sal de cura, apresentaram alterações em suas características sensoriais, como cor esverdeada e odor pútrido.

Segundo Milani et al. (2002), as alterações das características sensoriais da lingüiça são resultado da ação dos microrganismos indesejáveis presentes. A lingüiça é um embutido com elevada atividade de água, portanto se constitui em um meio propício ao rápido desenvolvimento destes microrganismos.

Dentre as alterações que ocorrem devido a presença de microrganismos contaminantes, Jay (1994) afirma que o esverdeamento apresentado é derivado de alterações microbiológicas. De acordo com Franco & Landgraf (1996), o esverdeamento promovido

por ação bacteriana produtora de H<sub>2</sub>S ocorre geralmente em carnes frescas embaladas a vácuo, mantidas em temperaturas entre 1° e 5°C. O H<sub>2</sub>S vai reagir com o pigmento da carne (mioglobina) e vai formar a sulfomioglobina, de coloração verde, concordando com Delazari (1977). Esse último autor afirma também que para as carnes curadas embaladas à vácuo, a causa do esverdeamento é a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido principalmente por *Pseudomonas sp.*, *Lactobacillus viridensis*, *Leuconostoc sp.*, que são contaminantes principalmente em equipamentos. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formada, combina-se com o nitrito formando o hemocromo nitroso, resultando na coloração esverdeada.

### **Conclusão**

De acordo com os resultados obtidos, observamos a eficiência dos conservantes nitrato e nitrito sobre o microrganismo *Clostridium perfringens* tipo A.

### **Referências**

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Aprova o Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos". Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Aprova o Regulamento Técnico: "Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – Carne e Produtos Cárneos". Portaria nº1004, de 11 de janeiro de 1998a.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Lista os produtos comercializados no país, enquadrando-os nas Sub-categorias que fazem parte da Categoria 8 – Carnes e Produtos Cárneos. Portaria nº1002, de 11 de dezembro de 1998b.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de produtos de origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade das Lingüiça. Instrução Normativa nº4, de 31 de março de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Laboratório de Microrganismos de Referência, do Instituto Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Rio de Janeiro. 2005.

CÂMARA, S.A.V. Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, no período de 1998 – 2001. Monografia apresentada para obtenção do título de especialista para a escola de Saúde Pública “Dr. Jorge David Nasser” – Gestão em Saúde. Secretaria de Estado de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 2002. Disponível em: <[http://dtr2001.saude.gov.br/bvs/ct/pdf/sonia\\_aparecida.pdf](http://dtr2001.saude.gov.br/bvs/ct/pdf/sonia_aparecida.pdf)> Acesso em: 22/07/2005.

DELAZARI, I. Microbiologia de carnes. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**. n.52, p.25-53, 1977.

FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. **Higiene Veterinaria de los Alimentos**. Zaragoza (Espana): Editorial Acribia, S.A., 1995. 669 p.

FERNANDEZ, A.T.; CASTRO, F.; BECKER, C. M. Avaliação do teor de nitritos e da comercialização de lingüiças clandestinas obtidas no município de Petrópolis / R.J.Escola de Medicina Veterinária. Universidade do Grande Rio. João Campos Bonisson. Disponível em: <[www.unigranrio.br/veterinaria/nitritosemlinguicas.doc](http://www.unigranrio.br/veterinaria/nitritosemlinguicas.doc)> Acesso: 10/05/2005.

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

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S.A., 1993. 681 p.

HAYES, P.R. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S.A., 1993. 369p.

HERSOM, A.C.; HULLAND, E.D. **Conservas Alimenticias**. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A., 1985. 451 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecología microbiana de los alimentos 1. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, 1980. 332 p.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A., 1994. 804 p.

LARA, W.H., TAKAHASHI, M.Y., SILVEIRA, N. Determinação de nitratos e nitritos em conservas de carne. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 38, p.161-166, 1978.

LINDNER, E. **Toxicologia de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia S.A., 1995. 262p.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. **Microbiologia de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S.A., 1985. 375p.

MILANI, L.I.G.; FRIES, L.L.M.; PAZ, P.B.; BELLÉ, M.; TERRA, N.T. Bioproteção de lingüiça de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.23, n.2, 2002.

ÖZTEKIN, N.; NUTKU, M.S.; ERIM, F.B. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in meat products and vegetables by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**. v.76, p.103-106, 2002.

PARDI, C.M; SANTOS, L.F; SOUZA, E.R; PARDI, H.S; **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 1ª edição. v 1. Goiânia: Editora UFG, 1995. 586 p.

PÉREZ-RODRIGUES, M. L.; BOSCH-BOSCH, N.; GARCÍA-MATA, M. Monitoring nitrite and nitrate residues in frankfurters during processing and storage. **Meat Science**. v.44, p. 65-73, 1996.

PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, M.A. FIA evaluation of nitrite and nitrate contents of liver pâtés. **Food Chemistry**, v. 62, n.3, p. 359-362, 1998.

SHAHIDI, S.A.; FERGUSON, A.R. New Quantitative, Qualitative, and Confirmatory Media for Rapid Analysis of Food for *Clostridium perfringens*. **Applied Microbiology**. v.21, n.3, p. 500-506, 1971.

SILVA, N.; JUNQUEIRA V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SOARES, A.L.; ODA, S.H.I.; LARA, J.A.F.; YAMASHITA, F.; IDA, E.I.; SHIMOKOMAKI, M. Ingredientes e Aditivos para carnes: segurança e inovação. **Revista Nacional da Carne**. Artigo Técnico. Edição n°317, v.22, n.259, p.18-22, 2003.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Ed. UNISINOS, 1998. 216p.