

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ – UEM  
Centro De Ciências Agrárias  
Departamento de Medicina Veterinária  
Programa de Pós Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal

RAFAELLA DA SILVA

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CURA  
NA AÇÃO DOS CONSERVANTES EM LINGUIÇAS FRESCAIS

UMUARAMA  
ESTADO DO PARANÁ  
FEVEREIRO/ 2021

RAFAELLA DA SILVA

Influência da temperatura de cura na ação dos conservantes em linguças frescas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária.

Área de concentração: Inspeção de Produtos de Origem Animal

Linha de pesquisa: Produção Sustentável

Orientador: Prof. Dr Oduvaldo Câmara Marques Pereira Junior

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Marques Munhoz

UMUARAMA  
ESTADO DO PARANÁ  
FEVEREIRO/ 2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S586i

Silva, Rafaella da

Infuência da temperatura de cura na ação dos conversantes em linguiças frescas /  
Rafaella da Silva. -- Umuarama, PR, 2021.  
63 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira Júnior.

Coorientador: Prof. Dr. Patrícia Marques Munhoz.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências  
Agrárias, Departamento de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em  
Produção Sustentável e Saúde Animal, 2021.

1. Nitrito. 2. Nitrato. 3. Escherichia coli. 4. Staphylococcus coagulase positiva. 5.  
Salmonella spp.. I. Pereira Júnior, Oduvaldo Câmara Marques, orient. II. Munhoz, Patrícia  
Marques, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias.  
Departamento de Medicina Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Produção  
Sustentável e Saúde Animal. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.40852

Márcia Regina Paiva de Brito - CRB-9/1267

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaella da Silva

Influência da temperatura de cura na ação dos  
conservantes em linguiças frescas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

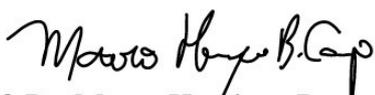
## COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira Junior  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)



Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez  
Universidade Estadual de Maringá (Membro)



Prof. Dr. Mauro Henrique Bueno de Camargo  
Universidade Estadual de Maringá (Membro)

Aprovada em: 12 de fevereiro de 2021.

Local da defesa: Remota.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Joaquim e Nair que me apoiaram desde o início e me deram todas as oportunidades para chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar o cumprimento dessa etapa tão desejada;

A minha família por sempre apoiarem minhas decisões, em especial ao meu pai por não medir esforços para realização dos meus sonhos, e minha mãe pela dedicação e doçura em tudo que faz por mim;

A professora Dr.<sup>a</sup> Patrícia Marques Munhoz pelos conhecimentos e experiência compartilhada, além de comprometimento e responsabilidade com o meu trabalho;

Ao professor Dr. Oduvaldo Câmara Marques Pereira Junior por todas as informações e contribuições desde o início;

Ao professor Dr Ferinc Bankutti por ser sempre prestativo e propor considerações importantes na visão empreendedora;

A professora Dra Sheila Rezler Wosiacki pelos conhecimentos de microbiologia e experiência compartilhada;

Ao professor Dr. Antônio Campanha Martinez por sempre me incentivar a continuidade desta pesquisa;

A todos os professores Programa de Pós Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal que desenvolveram um excelente trabalho durante as disciplinas;

Aos colegas de turma pela parceria e conhecimentos compartilhados.

## **Influência da temperatura de cura na ação dos conservantes em linguiças frescas**

### **RESUMO**

Considerada um alimento obtido de diversas etapas de manipulação e pouca tecnologia de transformação, a linguiça frescal tem potencial chance de envolvimento nos surtos de DTA. Neste sentido, a preservação faz-se necessária com o intuito de prolongar a vida útil do embutido por meio da adição de conservantes. Dentre estes, os mais utilizados constituem os sais de nitrito e nitrato. Entretanto, seu uso indiscriminado pode resultar em compostos nitrosos – subprodutos de caráter carcinogênico. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar o efeito do aumento da temperatura de descanso de massas de linguiças frescas de carne suína e o teor de nitrito/nitrato e perfil microbiológico, sendo as amostras coletadas de 04 lotes distintos em uma Fábrica de Embutidos localizada no município de Umuarama-Pr. Foram enviadas 04 repetições de 500 g de cada lote, totalizando 16 amostras, ao laboratório de análises de alimentos acreditado junto ao MAPA. Exclusivamente para realização do experimento, a massa de preparo foi previamente submetida a duas diferentes temperaturas de descanso/cura: refrigerada (0°C) e ambiente (25°C). Os resultados microbiológicos e físico-químicos obtidos demonstraram influência negativa do descanso de massa em temperatura ambiente quando comparado ao processo de cura em refrigeração, representados especialmente pela análise estatística de *Staphylococcus* coagulase positiva e nitrito, ambos  $p < 0,05$ .

**Palavras-chave:** nitrito, nitrato, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E. coli*.

### **ABSTRACT**

Considered a food obtained from several stages of manipulation and little transformation technology, the fresh sausage has a potential chance of involvement in the outbreaks of ATD. In this sense, preservation is necessary in order to extend the life of the sausage through the addition of preservatives. Among these, the most used are the nitrite and nitrate salts. However, its indiscriminate use can result in nitrous compounds - by-products of a carcinogenic character. In this way, the present work sought to evaluate the effect of increasing the resting temperature of fresh pork sausages pasta and the nitrite / nitrate content and microbiological profile, with samples collected from 04 different batches in a Embutido Factory located in the municipality of Umuarama-Pr. 04 repetitions of 500 g of each batch, totaling 16 samples, were sent to the food analysis laboratory accredited by MAPA. Exclusively to perform the experiment, the preparation mass was previously subjected to two different resting / curing temperatures: refrigerated (0°C) and room (25°C). The microbiological and physical-chemical results obtained demonstrated a negative influence of the mass rest at room temperature when compared to the refrigeration curing process, represented especially by the statistical analysis of positive coagulase and nitrite *Staphylococcus*, both  $p < 0.05$ .

**Keywords:** nitrite, nitrate, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E. coli*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC: *Official Methods of Analysis International*

CMS: Carne Mecanicamente Separada

DTA: Doença Transmitida por Alimento

ECP: Estafilococos coagulase positiva (ECP)

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FDA: *Food and Drug Administration*

IN: Instrução Normativa

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NaCl: Cloreto de Sódio

NaNO<sub>2</sub>: Nitrito de Sódio

°C: Graus Celsius

pH: Potencial hidrogeniônico

ppm: Partes por milhão

RDC: Resolução de Diretoria Colegiada

RIISPOA: Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SIM: Serviço de Inspeção Municipal

SIP: Serviço de Inspeção do Paraná

UFC: Unidade Formadora de Colônias

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** Ilustração das quatro repetições coletadas de cada lote em que metade foram descansadas em temperatura de refrigeração (0°C) e o restante, em temperatura ambiente (25°C).....18.

**Figura 2:** Perfil de desenvolvimento de *Escherichia coli* em massas de linguiças descansadas temperatura refrigerada (0°C) ou ambiente (25°C).....22.

**Figura 3:** Perfil de desenvolvimento de *Staphylococcus coagulase positiva* em massas de linguiças descansadas sob temperatura refrigerada (0°C) e ambiente (25°C).....23.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Tabela de Resultados e Análise de Variância.....	20
<b>Tabela 2:</b> Resultados microbiológicos de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C).....	21
<b>Tabela 3:</b> Resultados microbiológicos ( <i>E. coli</i> ) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).....	22
<b>Tabela 4:</b> Resultados microbiológicos ( <i>S. coag. positiva</i> ) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).....	23
<b>Tabela 5:</b> Resultados microbiológicos ( <i>Salmonella spp</i> ) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).....	24
<b>Tabela 6:</b> Resultados físico-químicos para quantificação de nitrito e nitrato em linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Conservas em Umuarama-Pr a partir de massas submetida a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C).....	25
<b>Tabela 7:</b> Lista de padrões microbiológicos para alimentos segundo IN n. 60/ 2019 (ANVISA) para determinação da qualidade do produto final.....	28

## SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2. HIPÓTESES.....	18
3. OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivo Geral.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
4. JUSTIFICATIVA.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
5.1 Elaboração das linguças .....	19
5.2 Metodologia dos ensaios microbiológicos e físico-químicos.....	21
5.3 Análise Estatística .....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1 Ensaio microbiológicos .....	23
6.1.1 – <i>Escherichia coli</i> .....	24
6.1.2 – <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....	25
6.1.3 – <i>Salmonella spp</i> .....	26
6.2 Ensaio físico-químicos.....	27
7. DISCUSSÃO.....	28
8. CONCLUSÕES.....	31
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
PARTE II – ARTIGO CIENTÍFICO .....	37

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dentre os alimentos da dieta humana, a carne destaca-se por seu elevado perfil nutritivo, representando a principal fonte de proteína de alto valor biológico (SOARES *et al.*, 2017). Possui aminoácidos essenciais e minerais de grande importância ao organismo, tais como ferro, zinco e magnésio, além de vitaminas do complexo B (BORHER, 2017). Indicativos históricos mostram que o consumo de carne não é recente. Dados científicos demonstram que a evolução do homem moderno propiciou um aumento no consumo de produtos de origem animal equivalente a 80% da energia de sua dieta quando comparada a de cerca de 50.000 anos atrás (GODFRAY *et al.*, 2018). Ainda segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO (2017), o crescimento exponencial da população vem permitindo um avanço no consumo crescente de carne, especialmente nos países mais desenvolvidos. A estimativa é que a produção de carnes até 2030 atinja a projeção de 34,2 milhões de toneladas entre carne de frango, bovina e suína.

Entretanto, a constituição intrínseca da carne favorece o processo de degradação microbiológica devido à presença considerável de água (42%), proteína (12%) e gordura (45%) (ORDONEZ, 2005; LISTRAT *et al.*, 2016). Seu pH tende a manter próximo a neutralidade e, imediatamente após a morte do animal, a quantidade normal de glicogênio presente no músculo (1%) é convertida em ácido lático promovendo a redução do pH de aproximadamente 7,4 para 5,6 (CHARMPI *et al.*, 2020). Portanto, o pH influencia não somente na microbiota que pode se desenvolver, mas também no estado de conservação do produto (KIM *et al.*, 2016). Soma-se a isto o fato de que a condição de armazenamento do alimento tem influência direta em seu tempo de vida útil (XIONG, 2017). Daí a importância deste subproduto ser acondicionado em ambientes higiênicos e sob refrigeração adequada (LI *et al.*, 2017), sendo fundamental o monitoramento da temperatura do mesmo ao longo de todo processo (GEORGES *et al.*, 2019).

Neste cenário, os microrganismos (patogênicos ou deteriorantes) tais como *Salmonella* spp, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Escherichia coli* dispõem de meios propícios para o desenvolvimento e podem estar presentes no produto final (ARKON *et al.*, 2017) tornando-o um risco potencial na causa de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (DE MORAIS *et al.*, 2018). De qualquer forma, a presença de microrganismos

deteriorantes é inevitável, sendo possível controlar o seu número, enquanto os patógenos devem ser evitados (SOARES *et al.*, 2015).

Diante disto, a população tem buscado, desde a antiguidade, preservar as características dos alimentos através de processos e tecnologias de transformação. A crescente demanda pelos consumidores resultou na elaboração de produtos diversificados advindos de produtos a base de carnes e vísceras bovinas, suínas e de aves (RESENDE FILHO; DE SOUZA; LIMA, 2016). Neste contexto, a linguiça frescal configura parte da grande variedade de derivados cárneos, dentre os produtos processados, representando uma alternativa ao reaproveitamento de partes menos nobres. A seu favor tem-se ainda o relativo baixo custo de produção e a expressiva aceitação pelo mercado consumidor (BEZERRA *et al.*, 2012). Segundo Colombo, Bachini e Silva (2016), o mercado de embutidos se caracteriza pela significativa expansão e alta competitividade já que tornou parte do hábito alimentar de significativa porção dos consumidores brasileiros, sendo a linguiça frescal de grande destaque pelo seu processamento simples, além de se mostrar em geral a um preço mais acessível.

Por se tratar de um alimento com grandes variações na fabricação e matéria prima, as legislações regulamentam os requisitos básicos e características para os diferentes tipos de produtos processados. Sendo assim, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) define linguiça como “o produto cárneo obtido de carnes cominuídas das diferentes espécies animais, condimentado, com adição ou não de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido a processo tecnológico específico” (BRASIL, 2017). A linguiça frescal, de acordo com Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000, se caracteriza por ser um produto cru e curado, de carne, gordura e outros ingredientes. As características físico-químicas da linguiça frescal regida pela mesma legislação estabelece: 70% de umidade máxima, 30% de gordura, 0,1% de cálcio (base seca) e no mínimo, 12% de proteína sendo proibida a adição de carne mecanicamente separada (CMS) (MAPA, 2000). Desta forma, variações são permitidas desde que indiquem e respeitem a composição regulamentada referente a ingredientes obrigatórios, ingredientes opcionais, teor de gordura, umidade, proteína, e demais fatores de qualidade determinados para o tipo de produto em questão. A normativa tem por objetivo criar condições de igualdade e transparência na produção de linguiças, fixando suas características em relação aos padrões oficiais exigidos (MAPA, 2000).

Além da padronização, Adami *et al.*, (2015a) consideram que a qualidade dos produtos frescos requer a inserção de obstáculos que dificultem a sobrevivência, desenvolvimento e permanência dos microrganismos. Cintra *et al.*, (2016) ressaltam a influência do emprego de baixas temperaturas como fator importante na preservação da estabilidade microbiológica e segurança do alimento. A associação das condições de tempo e temperatura, durante todo o processo de obtenção do produto, é de suma importância para a qualidade dos mesmos (MERCIER *et al.*, 2017). Além disso, embora haja diversas etapas de manipulação durante a produção de linguiças frescas, importa salientar que sua formulação não é submetida a nenhum processamento tecnológico que promova a redução de microrganismos deteriorantes ou patogênicos (MONTEIRO *et al.*, 2017). Em consequência, há possibilidades de surtos de DTAs resultante da contaminação em situações inadequadas de higiene do ambiente e manipuladores (RESENDE FILHO; DE SOUZA; LIMA, 2016).

Dentre os principais microrganismos implicados em tais surtos, os estafilococos coagulase positiva (ECP) são bactérias que produzem coagulase livre. Desta forma, a enzima é capaz de coagular plasma, consistindo, portanto, em um fator de virulência (FEITOSA *et al.*, 2017). O patógeno é elemento importante na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica, e é transmitido aos alimentos especialmente pelo homem e por condições inadequadas de higiene, além da ocorrência de contaminação cruzada entre equipamentos, utensílios e matéria prima (SILVA; FEITOSA; RODRIGUES, 2017). Tratam-se de bactérias potencialmente produtoras de enterotoxinas, conferindo características de risco atreladas a contaminação (DE ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2019).

Entre os problemas mais alarmantes de saúde pública em todo mundo, as doenças causadas por *Salmonella* spp., e transmitidas por alimentos, também apresentam risco em potencial para o consumidor (ED-DRA, *et al.*, 2017). Este microrganismo possui atualmente mais de 2600 sorotipos, e dentre as de maior importância para a saúde humana estão a *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar *Typhi*, causadora de infecções sistêmicas e febre tifoide, e a *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar *Typhimurium*, agente causador de gastroenterites (CHRISTIEANS, *et al.*, 2018). A IN nº 60/ 2019 e RDC nº 331/ 2019 preconizam como requisito microbiológico único para carnes de aves, bovina, suína e outras, sendo cruas ou não, a ausência de *Salmonella* em 25 g, independente do sorotipo (BRASIL, 2019b; BRASIL, 2019c).

Outro microrganismo de relevância e responsável pela recolha de produtos alimentícios é a *Escherichia coli*. Trata-se de uma bactéria bacilar Gram negativa, encontrada no trato gastrointestinal inferior dos organismos de sangue quente (endotérmicos), e sua presença em água ou alimentos é indicativo de contaminação fecal (DUCIC *et al.*, 2016). Embora a maioria das estirpes sejam inofensivas, alguns sorotipos podem causar graves intoxicações alimentares nos seres humanos (CHRISTIEANS *et al.*, 2018), constituindo causa importante nos quadros de gastroenterites, como é o caso da *Escherichia coli* O157:H7, causadora de colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica. Esta, atrelada à baixa dose de infecção e a gravidade da doença, representa uma preocupação frente a saúde pública (ROSA; BARROS; SANTOS, 2016).

Soma-se a isto ainda a microbiota natural do animal (CHOI *et al.*, 2020) e outras prováveis fontes de contaminação, tais como os envoltórios (COLOMBO; BACHINI; SILVA, 2016), condimentos, e até mesmo a água utilizada em todo o processo de fabricação do produto em si (ADAMI *et al.*, 2015a).

Segundo Tapia, Alzamora e Chirife (2020), a ausência de processamento térmico ou dessecação, somado a alta atividade de água, influenciam no curto prazo comercial do produto. Isso porque a qualidade microbiológica do produto final resulta da ausência, ou baixos níveis, de contaminação da matéria prima e demais ingredientes adicionados à formulação.

Neste sentido, a implantação de boas práticas de fabricação na elaboração de produtos frescos torna-se elemento fundamental no que diz respeito à saúde do consumidor (NERIN; AZNAR; CARRIZO, 2016). Também se faz necessária a atuação dos órgãos fiscais presentes desde a obtenção da matéria prima, fabricação, até a comercialização - por meio de rigorosos padrões de higiene do ambiente e utensílios. Hábitos e conduta dos colaboradores também são fundamentais neste sentido (FIGUEIREDO; RECINE; MONTEIRO, 2017). No caso da linguiça, a carne e demais ingredientes percorrem longas e numerosas fases até chegar à mesa do consumidor, e estas podem apresentar riscos potenciais à segurança do produto. As implicações iniciam-se pelo o abate do animal, seguido de transporte até a indústria beneficiadora por caminhão frigorífico. No entreposto, a carne é desossada, manipulada, condimentada e, por fim, embalada e estocada até o momento de envio (via caminhão frigorífico) para o comércio varejista. Neste ponto, já em posse do consumidor, será

transportada, estocada e preparada para consumo – fases também de alta importância higiênica (CINTRA *et al.*, 2016).

Neste contexto, os processos e tecnologias de transformação contribuem para a preservação das características dos alimentos, sendo os conservantes tradicionalmente de destaque no processo de elaboração de linguiça frescal. Os sais de cura comumente utilizados no processo de fabricação de embutidos crus contemplam o nitrito e nitrato de sódio (JUNG, S. *et al.*, 2015). Popularmente conhecido como “cura”, o recurso permite um controle da deterioração por microrganismos patogênicos (JIN, S. K *et al.*, 2018). Adami *et al.*, (2015b) relataram que os sais de nitrito e nitrato são empregados como aditivos alimentares para a prevenção da proliferação de esporos – importantes causadores de graves alterações nos produtos cárneos, com repercussão na saúde humana. Além disso, a literatura comprova que tais conservantes possibilitam o alcance aos parâmetros característicos de qualidade sensorial, maximizando cor, sabor, aroma e textura (HONIKEL, 2008), permitindo a oferta de variações no material cru, nas formulações e diferenças em processos e técnicas aplicadas. Outro relato científico constatou também, além da conferência de cor e sabor característicos de carne curada pelos sais nitrito e nitrato, uma significativa inibição da oxidação lipídica de linguiças frescas, aumentando assim o tempo de conservação do produto (DOMINGUES *et al.*, 2019).

Por outro lado, o uso desses aditivos é legalmente restrito há décadas devido aos efeitos adversos cumulativos, principalmente relativos ao nitrito – subproduto da redução do nitrato, reação que ocorre tanto no organismo quanto nos alimentos (PEGG; SHAHIDI, 2004; GIROT, MASSON e HARACEMIV, 2011). Seu efeito tóxico é causado pela formação endógena de compostos nitrosos como a N-nitrosodimetilamina e monometilnitrosamina (nitrosaminas e nitrosamidas) ambas de caráter carcinogênico, mutagênico e teratogênico (WANG *et al.*, 2018). Ademais, quando ingeridos em excesso, os nitritos unem-se irreversivelmente à hemoglobina e originam um quadro de hemoglobinemia, também conhecido por “Síndrome do Bebê Azul”. Isto porque quando o nitrito encontra-se presente no organismo, principalmente de crianças, causa oxidação da hemoglobina acarretando em efeitos nocivos, dentre eles o menor aporte de oxigênio para o corpo. Tal doença pode levar a anoxia e morte (HENTGES *et al.*, 2016). Deste modo, tem-se que os nitratos são relativamente pouco tóxicos para os seres humanos, mas a sua toxicidade e relevância neste sentido está atribuída principalmente à sua redução a nitrito (WANG *et al.*, 2018).

A preocupação frente à presença de nitrosaminas nos alimentos ocorre desde 1968, quando pesquisas realizadas pela agência estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA) foram iniciadas com intuito de se reduzir os níveis de nitrosaminas e encontrar substitutos para o nitrito como conservante alimentar. No Brasil, o Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por determinar o limite do teor residual de nitrito no produto cárneo final a ser consumido, regido por meio da RDC nº 272/2019. Esta estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Também regulamenta e permite a adição de sais de nitrito e nitrato de sódio até os valores máximos de 150 mg/Kg e 300 mg/Kg de produto, respectivamente (BRASIL, 2019a).

Apesar da legislação vigente, embutidos oriundos de produção artesanal ou de marcas desconhecidas e desprovidas de qualquer fiscalização de ordem sanitária, podem apresentar desconformidades em relação aos padrões oficiais. Tais irregularidades versam especialmente no descumprimento relacionado ao limite máximo para nitrito nestes produtos. Sua oferta indiscriminada acaba por expor os consumidores a riscos inerentes à ingestão de alimentos processados em condições precárias e/ou irregulares, em especial aos aditivos empregados e suas quantidades excessivas (FLORES; TOLDRA, 2020).

Desta forma, considerando-se a importância industrial e os efeitos toxicológicos deste aditivo, torna-se de relevância pública e sanitária o monitoramento dos níveis de nitrito e nitrato por meio das determinações quantitativas desses compostos, visando a não exposição do consumidor a riscos à saúde, pois além de ser um problema direto àquele que consome, traz também problemas indiretos à sociedade: ausência no trabalho, maiores gastos do sistema público de saúde junto ao tratamento destas pessoas e redução da arrecadação fiscal – produtos não inspecionados geralmente são comercializados de forma clandestina, portanto, não recolhem impostos.

Neste sentido, o objetivo deste estudo será avaliar a correlação entre temperatura e o teor de nitrito e nitrato, bem como o perfil microbiológico em amostras de linguiças frescas de carne suína com duas temperaturas de cura distintas: ambiente (25°C) *versus* resfriada a 0°C.

## **2. HIPÓTESES**

O aumento da temperatura de descanso/ cura de massa exerce influência sobre os parâmetros de nitrito e nitrato em linguiças frescas, bem como nos padrões microbiológicos.

## **3. OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo Geral

Determinar a influência da temperatura do descanso de massa na qualidade do processo tecnológico de linguiças frescas

### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a partir das análises de nitrito e nitrato a influência da temperatura de descanso de massa
- Avaliar o perfil de bactérias através de análises microbiológicas para *Staphylococcus coagulase positiva*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*.

## **4. JUSTIFICATIVA**

Considerando que: (1) o nitrato é reduzido a nitrito por meio de reações químicas e microbiológicas (WANG *et al.*, 2018); (2) os sais de nitrito apresentam efeitos adversos por originar compostos nitrosos de ação carcinogênica (SONG; WU; GUAN, 2015); (3) a promoção da saúde pública é fato indiscutível - torna-se essencial um estudo que permita avaliar o impacto da temperatura dos processos da fabricação (cura) de linguiças frescas, comparado ao poder de conservação e vida útil do produto.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Elaboração das linguiças**

O experimento foi conduzido a partir de amostras de linguiças frescas de carne suína coletadas de 04 lotes distintos em uma Fábrica de Embutidos inscrita no Serviço de Inspeção Estadual do Paraná (SIP), localizada no município de Umuarama-Pr. Foram coletadas 04 repetições de 500 g de cada lote, totalizando 16 amostras (Figura 1).

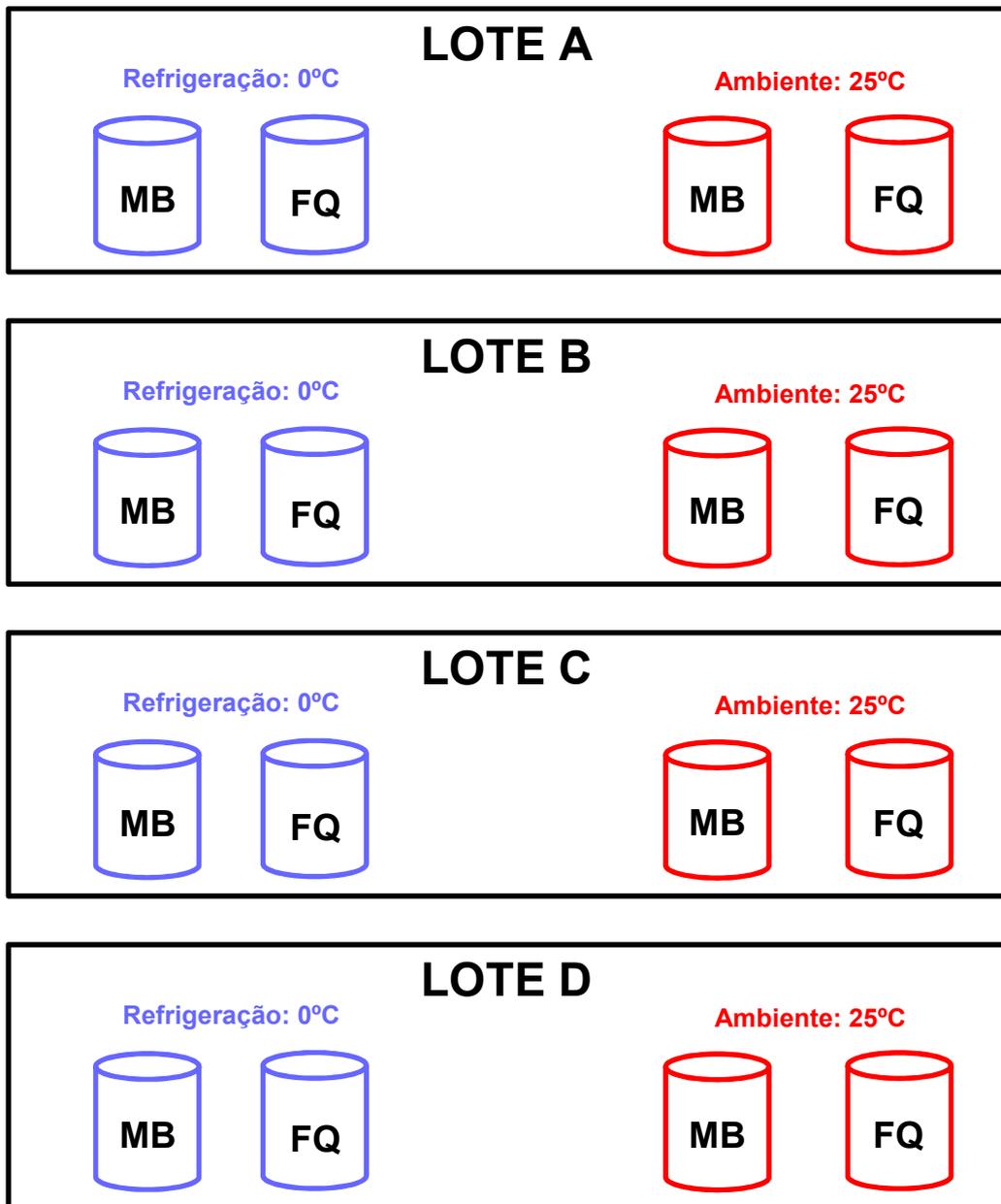
O processo de elaboração das linguiças frescas foi realizado de acordo com as normas de Boas Práticas e Fabricação (BPF) determinadas para estabelecimentos de manipulação de alimentos. Desta forma, as formulações e modo de preparo seguiram os padrões de qualidade registrados junto ao órgão fiscalizador, obedecendo a seguinte sequência de operações: moagem das carnes e gorduras; condimentação; cura (descanso de massa); embutimento e embalagem.

O processo de condimentação consistiu na adição de ingredientes junto à massa, seguida do emprego dos sais de cura compostos por: sal refinado (88%), nitrito (10%) e nitrato de sódio (2%).

Exclusivamente para realização do experimento, a massa de preparo foi separada em duas partes iguais: uma parte submetida ao processo de cura em refrigeração (0°C) e o restante, a ação dos sais de cura ocorreu em temperatura ambiente (25°C), ambos pelo tempo de 12 horas.

As linguiças foram enviadas sob refrigeração para transporte até o laboratório de análises de alimentos credenciado junto ao MAPA.

**Figura 1:** Ilustração das quatro repetições coletadas de cada lote em que metade foram descansadas em temperatura de refrigeração (0°C) e o restante, em temperatura ambiente (25°C).



MB: Microbiológico/ FQ: físico-químico

Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

## 5.2 Metodologia dos ensaios microbiológicos e físico-químicos

As análises de quantificação dos teores de nitrato e nitrito foram realizadas de acordo com a metodologia NMKL 194:2013 – “*Nitrate and Nitrite - Determination of nitrate and nitrite in food stuffs and water spectrophotometric after zinc reduction and griess reaction*”. Trata-se do método de maior reconhecimento e relevância para o doseamento de nitrato e nitrito mediante espectrofotometria, baseado na reação de Johann Peter Griess (1829-1888).

Os ensaios microbiológicos foram realizados com diferentes metodologias de acordo com cada microrganismo, sendo:

- Contagem de *Escherichia coli*: técnica de inoculação em superfície pelo método AOAC 998.08;
- Pesquisa de *Salmonella* spp.: técnica de ensaio para detecção molecular pelo método AFNOR Validation 3M 01/16 - 11/16 3M;
- Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva: técnica de inoculação em superfície pelo método ISSO 6888-1

### 5.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se o programa computacional SAS - versão *SAS University Edition* (SAS INSTITUTE INC. 2020).

Realizando-se primeiramente uma análise exploratória dos dados, foi verificada que a pressuposição de normalidade não foi atendida para o parâmetro *Coliformes termotolerantes* (Coliformes). Deste modo, foi necessário transformar os dados originais pelo logarítmico na base 10 ( $\log_{10}$ ) através da potência ótima de Box;Cox (1964), assim:  $\text{Coliformes}_T = \log_{10} \text{Coliformes}$ .

A fim de analisar os parâmetros mensurados (*E. coli*, *Staphylococcus*, nitrito e nitrato) nas amostras, foi realizada análise de variância (Anova) que incluiu o efeito de temperatura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) através da Proc Anova do SAS. Em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, sendo que o modelo ficou definido como:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Temp}_i + e_{ij}, \text{ onde:}$$

$Y_{ij}$  = i-ésima Observação na j-ésima Temperatura;

$\mu$  = estimativa de média geral;

$\text{Temp}_j$  = efeito da j-ésima Temperatura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C);

$e_{ij}$  = erro aleatório inerente a cada observação  $\sim \text{NID}(0, \sigma^2_e)$ .

Em virtude dos resultados obtidos para *Salmonella spp* serem idênticos para todas as amostras, não foi necessário realizar inferência estatística para a mesma.

Os testes foram realizados com  $P < 0,05$ , ou seja, com nível de significância de 5%.

Tabela 1: Tabela de Resultados e Análise de Variância					
Variável	Modelo	Nível Signif.	N	Resultado -Temperatura (Pr > F)	
<i>E.coli</i>	= Temperatura	5%	16	0,5640 Não Signif.	
<i>Staphylococcus</i>	= Temperatura	5%	16	0,0029 Significativo	
Nitrito	= Temperatura	5%	16	0,0304 Significativo	
Nitrato	= Temperatura	5%	16	0,2605 Não Signif.	

➤ Os resultados destacados em verde são significativos a 5%, ou seja, as médias são diferentes para o efeito de temperatura (0° e ambiente).

➤ Os valores destacados em laranja não são significativos a 5%, ou seja, as médias não são diferentes para o efeito de temperatura (0° e ambiente).

Fonte: Arquivo Pessoal, 2021.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Ensaios microbiológicos

A análise das amostras para o desenvolvimento microbiológico de *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* spp., em duas diferentes temperaturas de descanso de massa: 0°C e ambiente (25°C), apresentou os resultados descritos na Tabela 2.

Patógeno	LOTE A		LOTE B		LOTE C		LOTE D	
	0°C	AMBIENTE	0°C	AMBIENTE	0°C	AMBIENTE	0°C	AMBIENTE
<i>Salmonella</i> spp	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>E. coli</i> (UFC / g)	4,7 x 10 <sup>1</sup>	7,0 x 10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>	5,3 x 10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	2,1 x 10 <sup>2</sup>
<i>S. coag. positiva</i> (UFC / g)	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	1,9 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	2,2 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	2,9 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	1,8 x 10 <sup>1</sup>

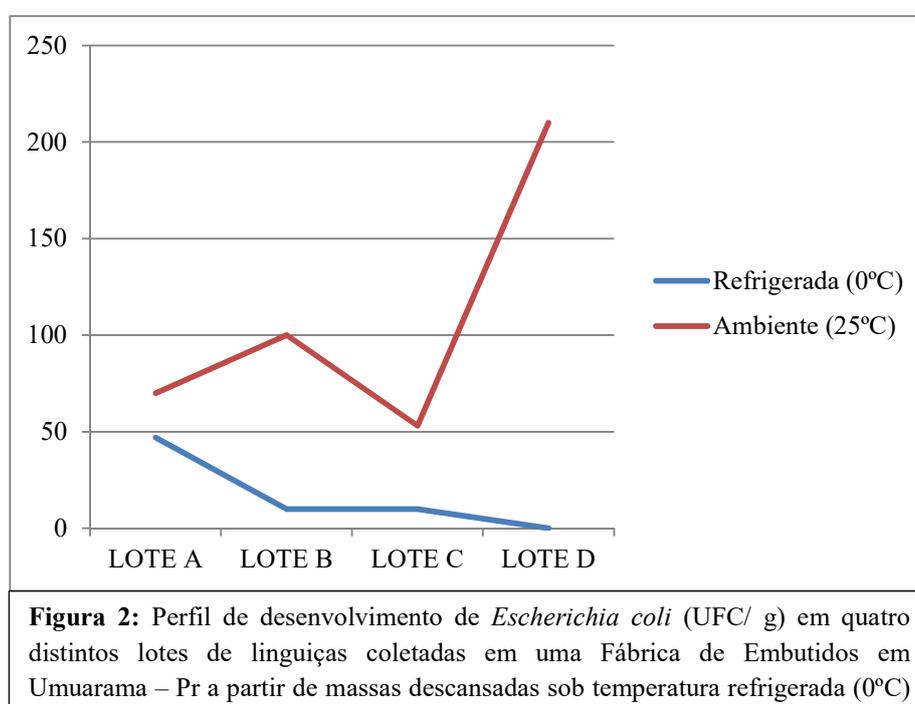
Fonte: Levantamento de dados, 2021.

### 6.1.1 – *Escherichia coli*

**Tabela 3:** Resultados microbiológicos (*E. coli*) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).

	Refrigerada (0°C)	Ambiente (25°C)
<b>LOTE A</b>	4,7 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	7,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE B</b>	1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	1,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/ g
<b>LOTE C</b>	1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	5,3 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE D</b>	<1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	2,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/ g

Fonte: Levantamento de dados, 2021.



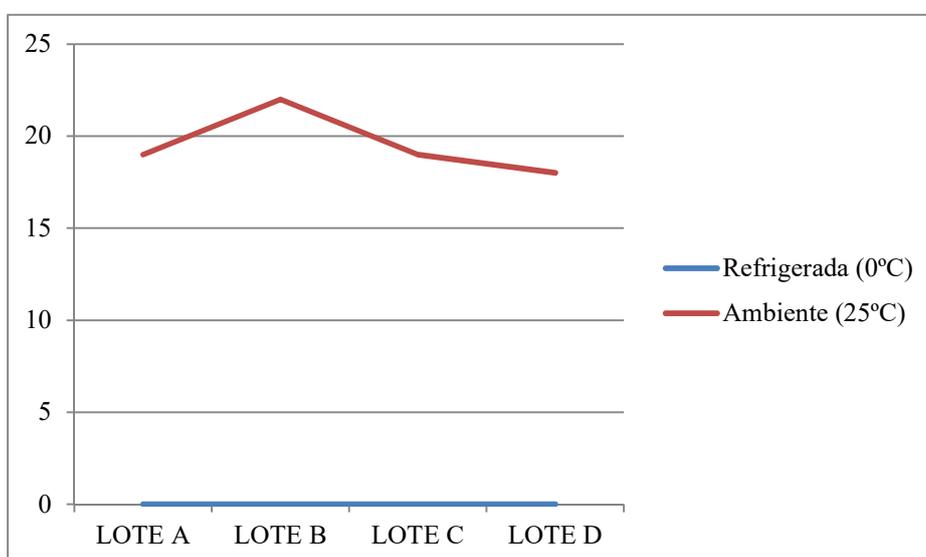
Fonte: Levantamento de dados, 2021.

### 6.1.2 – *Staphylococcus coagulase positiva*

**Tabela 4:** Resultados microbiológicos (*S. coag. positiva*) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).

	Refrigerada (0°C)	Ambiente (25°C)
<b>LOTE A</b>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	1,9 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE B</b>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	2,2 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE C</b>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	2,9 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE D</b>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	1,8 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g

Fonte: Levantamento de dados, 2021.



**Figura 3:** Perfil de desenvolvimento de *Staphylococcus coagulase positiva* (UFC/ g) em quatro distintos lotes de linguiças coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama – Pr a partir de massas descansadas sob temperatura refrigerada (0°C)

Fonte: Levantamento de dados, 2021.

### 6.1.3 – *Salmonella* spp

**Tabela 5:** Resultados microbiológicos (*Salmonella* spp) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).

	<b>Refrigerada (0°C)</b>	<b>Ambiente (25°C)</b>
<b>LOTE A</b>	Ausente/ 25 g	Ausente/ 25 g
<b>LOTE B</b>	Ausente/ 25 g	Ausente/ 25 g
<b>LOTE C</b>	Ausente/ 25 g	Ausente/ 25 g
<b>LOTE D</b>	Ausente/ 25 g	Ausente/ 25 g

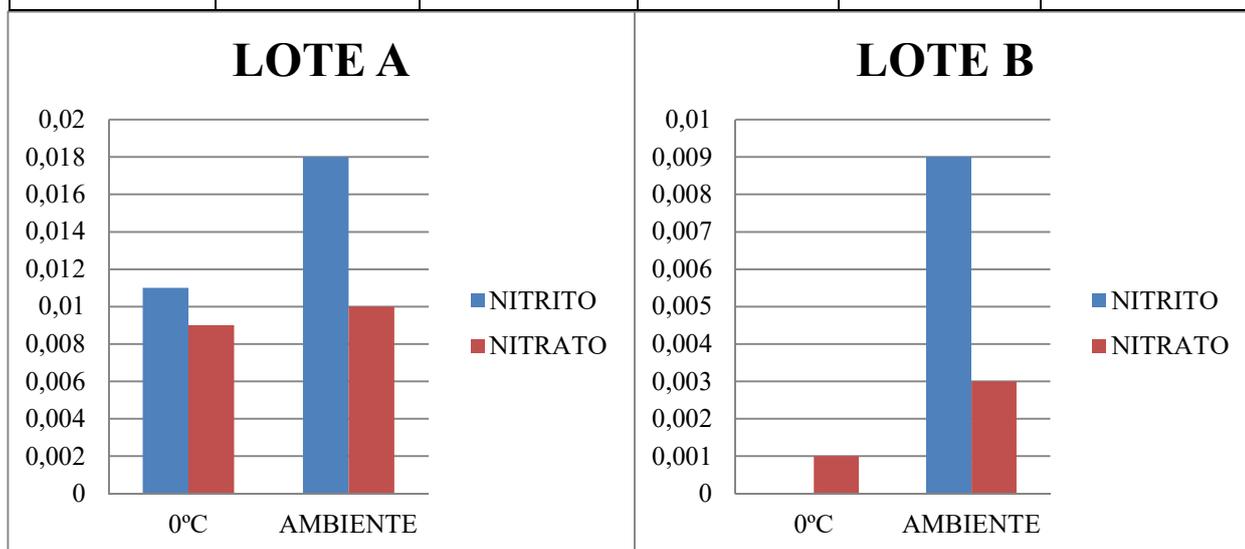
**Fonte:** Levantamento de dados, 2021.

## 6.2 Ensaio físico-químicos

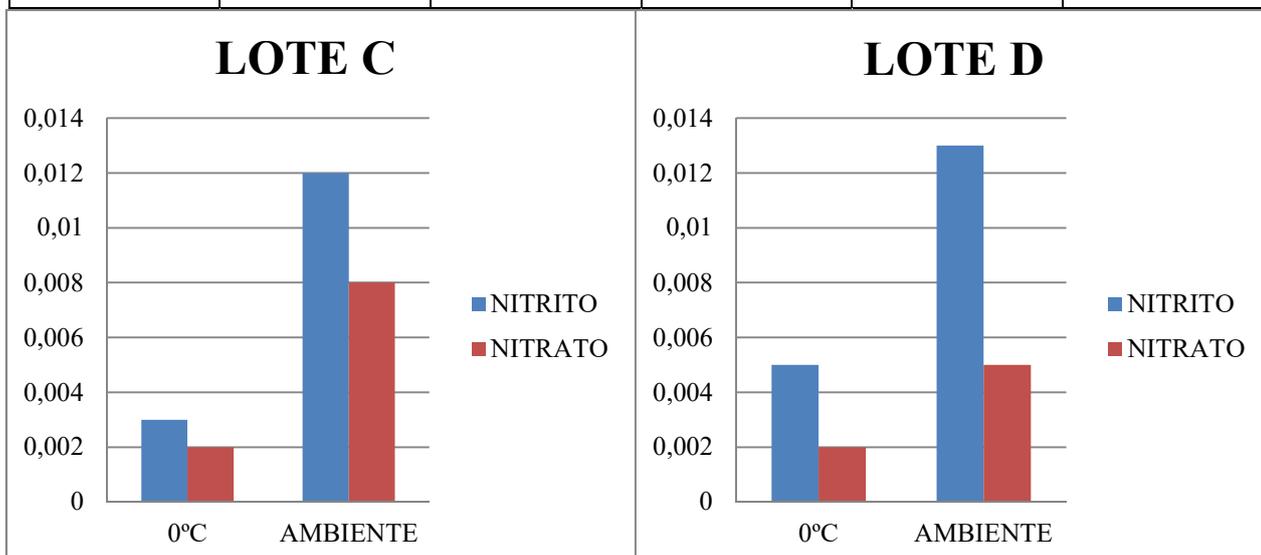
Na tabela 6 estão os resultados obtidos na análise das amostras para a quantificação de nitrito e nitrato em duas diferentes temperaturas de descanso de massa: refrigerada (0°C) e ambiente (25°C).

**Tabela 6:** Resultados físico-químicos para quantificação de nitrito e nitrato em linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Conservas em Umuarama-Pr a partir de massas submetida a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C)

LOTE A			LOTE B		
	0°C	AMBIENTE		0°C	AMBIENTE
<b>NITRITO</b>	0,011	0,018	<b>NITRITO</b>	<0,002	0,009
<b>NITRATO</b>	0,009	0,01	<b>NITRATO</b>	0,001	0,003



LOTE C			LOTE D		
	0°C	AMBIENTE		0°C	AMBIENTE
<b>NITRITO</b>	0,003	0,012	<b>NITRITO</b>	0,005	0,013
<b>NITRATO</b>	0,002	0,008	<b>NITRATO</b>	0,002	0,005



## 7. DISCUSSÃO

As amostras submetidas ao descanso de massa sob temperatura ambiente (25°C) obtiveram crescimento significativo ( $p < 0,05$ ) no que diz respeito ao perfil microbiológico de *Staphylococcus* coagulase positiva quando comparadas às formulações descansadas sob refrigeração (0°C). Já o desenvolvimento de *E. coli*, embora o efeito temperatura elevasse a curva de crescimento (Figura 2), não houve resultados significativos ( $p > 0,05$ ) conforme representado em análise estatística (Tabela 1). Para *Salmonella* spp., foi constatada ausência de unidades formadoras de colônias em todos os lotes analisados.

Neste cenário, De Andrade *et al.*, (2019) consideram a temperatura de acondicionamento de linguiças um agravante para a segurança deste, uma vez que contaminado por estafilococos, o alimento pode conter enterotoxinas estafilocócicas resultando em graves quadros de intoxicação alimentar ao consumidor. No presente estudo os resultados para crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva mostraram-se inferiores ao valor considerado capaz de provocar intoxicação: 106 UFC/ g de alimento (BARBOSA *et al.*, 2014). Mesmo as amostras analisadas não apresentando risco para intoxicações, observou-se influência da temperatura de descanso de massa a 25°C (ambiente), sendo o perfil de desenvolvimento obtido na faixa de 18 a 21 UFC/ g em comparação ao descanso a 0°C, quando a contagem indicou  $< 10$  UFC/ g. Por se tratar de microrganismos mesófilos, sua temperatura ideal de crescimento varia entre 7 e 47,8°C (FEITOSA *et al.*, 2017). Além da temperatura, a carga microbiológica da matéria prima é considerada outro fator de influência ao desenvolvimento de patógenos no produto final. Patarata *et al.*, (2020), demonstraram que a redução da contaminação na carne crua é fator favorável contra a multiplicação de microrganismos, entre ele a *Staphylococcus aureus*, espécie pertencente a classificação de estafilococos coagulase positiva.

Ao observar o comportamento da *Escherichia coli* no presente estudo, notou-se que o desenvolvimento de colônias em linguiças formuladas com massas submetidas ao descanso ambiente (25°C) foi de 70 UFC/ g e ultrapassou a quantidade estimada capaz de conferir doenças graves, já que segundo Meira *et al.*, (2017) menos de 50 organismos por grama de alimento pode promover quadros de diarreia com sangue, síndrome

hemolítico-urêmica e insuficiência renal aguda ao homem quando ingeridos alimentos infectados com baixa dose. Neste sentido, as infecções causadas pelo patógeno consistem em ameaça global para a segurança alimentar, agravadas pelo fato de que outros surtos graves com manifestações enterohemorrágica têm sido decorrentes da capacidade dos patógenos utilizarem respostas adaptativas a diferentes condições estressantes, podendo aumentar sua sobrevivência. Tal fato pode ser observado por McLeod *et al.*, (2016) ao induzirem um estresse em massas contendo níveis aumentados de NaCl, sendo a sobrevivência da *E. coli* registrada em duas temperaturas (20°C e 30°C). Com o intuito de levar a uma maior resistência ao estresse aplicado, demonstraram a capacidade de adaptação da *E. coli* ao sal e temperaturas médias. Na busca de produtos seguros, estudos têm sido desenvolvidos para reduzir a carga microbiana após processamento. Ducic *et al.*, (2016) confirmaram que, ao utilizar pasteurização em linguiças acabadas de porco, foi possível eliminar *E. coli* O157, ainda preservando-se a qualidade sensorial aceitável do produto acabado.

No presente estudo não houve presença de *Salmonella* spp. nas amostras dos diferentes lotes submetidos tanto a temperaturas de descanso de massa refrigerada (0°C) quanto ambiente (25°C). O resultado satisfaz a legislação brasileira regulamentada pela Instrução Normativa nº 60/ 2019, a qual prevê como aceitável a ausência de *Salmonella* spp em 25 g de alimento. O mesmo não foi observado por ED-DRA *et al.* (2017), os quais detectaram *Salmonella* spp em 21% das amostras avaliadas, sendo a maior prevalência em linguiças vendidas em camelôs (30,55%), seguidas de açougue (18,05%) e supermercado (12,5%). Nota-se que alguns estudos avaliam diferentes concentrações de nitrito de sódio e o seu efeito. HA *et al.*, (2016) avaliaram o crescimento de *Salmonella* spp em linguiças formulada com diferentes teores de cloreto de sódio (NaCl) e baixo nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>), seguido de armazenamento aeróbio ou a vácuo a 10°C e 15°C para até 816 h ou 480 h, respectivamente. O resultado obtido indicou que apenas 10 ppm de NaNO<sub>2</sub> pode aumentar o crescimento de *Salmonella* em baixas concentrações de NaCl, e que o NaCl desempenha papel importante na inibição do crescimento de *Salmonella* em salsichas com baixo NaNO<sub>2</sub>.

No ano de 2019, a ANVISA decidiu pela revogação da RDC nº 12, a qual regulamentava os padrões microbiológicos para alimentos desde 2001 (ANVISA, 2001). Desta forma, os novos padrões bem como sua aplicação foram definidos pela RDC nº 331/ 2019. Associado a isto, a autoridade sanitária optou por incluir uma lista

de padrões microbiológicos para alimentos sob o anexo de uma Instrução Normativa (IN nº 60/2019), no intuito de otimizar as atualizações e/ou correções já que o trâmite se torna mais ágil quando ocorre por meio de IN. A principal alteração refere-se ao plano de amostragem que poderá ser adotado pelos setores envolvidos na cadeia produtiva de alimento, visto que a autoridade sanitária permitiu que a empresa elaborasse seu próprio plano amostral de acordo com os parâmetros determinados pela nova instrução (BRASIL, 2019b; BRASIL, 2019c). Neste caso, para os microrganismos de interesse no presente estudo compreendem as seguintes determinações (Tabela 7):

**Tabela 7:** Lista de padrões microbiológicos para alimentos segundo IN n. 60/ 2019 (ANVISA) para determinação da qualidade do produto final.

<b>Categorias Específicas</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
c) Embutidos crus (linguiças frescas)	<i>Salmonella</i> / 25 g, para carne suína	5	0	Aus	-
	<i>Escherichia coli</i> / g, para carne suína	5	3	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
	Aeróbios mesófilos/ g	5	3	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>

**N:** número de unidades amostrais coletadas aleatoriamente/ **c:** qualidade intermediária (tolerada)/ **m:** limite mínimo/ **M:** limite máximo

Fonte: IN n.60/ 2019 (ANVISA)

A partir dessas informações, observa-se que neste experimento as amostras encontram-se dentro dos parâmetros aceitáveis de qualidade para o perfil microbiológico, levando-se em conta que o desenvolvimento para *Escherichia coli* não ultrapassou 210 UFC/ g (Tabela 3), *Staphylococcus* coagulase positiva não ultrapassou 22 UFC/ g (Tabela 4) e para *Salmonella* spp. foi ausente (Tabela 5).

O perfil físico-químico das amostras analisadas demonstrou aumento no teor de nitrito e nitrato em formulações de massas submetidas ao descanso em temperatura ambiente (25°C) em todos os lotes. Ao observar a legislação brasileira vigente, tem-se o estabelecimento do limite na adição de nitrato aos produtos cárneos não cozidos através da RDC nº 272/ 2019 (ANVISA) na ordem de 0,03 g/ 100 g do produto (300 ppm) e nitrito de sódio, 0,015 g/ 100 g (150 ppm) (BRASIL, 2019a). Deste modo, os lotes B, C e D são consideradas “amostras ideal” ao consumo humano. O mesmo não ocorre para o lote A, o qual demonstrou resultado expressivo em 0,018 g/ 100. Adami *et al.*, 2015b verificaram que 54,5% das amostras de linguiças produzidas em estabelecimento fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Sanitária Municipal (SIM) apresentaram nitrito acima do permitido e 100% das amostras apresentaram nitrato acima do permitido em pelo menos um dos lotes analisados.

## 8. CONCLUSÕES

O estudo demonstrou influência negativa do descanso de massa submetido à temperatura ambiente (25°C) em todos os lotes de linguiças frescas de carne suína analisados, observado através do crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli*, e pela quantificação de nitrito e nitrato, de maneira que a manutenção do frio ao longo da cadeia produtiva interfere na qualidade do produto final.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, F. S.; DAL BOSCO, S. M.; ALTENHOFEN, G.; DE SOUZA, C. F. V.; OLIVEIRA, E. C. Avaliação da qualidade microbiológica de linguiças e queijos. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 12, n. 1, 2015a.

ADAMI, F.S.; GIOVANAZ, L. S.; ALTENHOFEN, G.; DAL BOSCO, S. M.; MACADENTRI, A.; OLIVEIRA, E. C. Análise microbiológica e de nitrito e nitrato em linguiça. **Scientia plena**, v. 11, n. 5, 2015b.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **D. O. U. Brasília**, 2001 Jan 07.

ARKOUN, M.; DAIGLE, F.; HEUZEY, M.C.; AJJI, A. Mechanism of action of eletrospun chitosan-based nanofibres against meat spoilage and pathogenic bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 4, pág. 585, 2017.

BARBOSA, L. G.; MADEIRA JÚNIOR, R.; MARTINS, A. D. O.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, C. T. Avaliação de estafilococos coagulase positiva em uma unidade de alimentação pública do estado de Minas Gerais. **Revista Científica da Faminas**, v. 10, n. 1, 2014.

BEZERRA, M. V. P.; ABRANTES, M. R.; SILVESTRE, M. K. S.; SOUSA, E. S.; ROCHA, M. O. C.; FAUSTINO, J. G.; SILVA, J. B. A. Avaliação microbiológica e físico química de linguiça toscana no município de Mossoró, RN. **Arq Inst Biol**, v. 79, n. 2, p. 297-300, 2012.

BOHRER, B. M. Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat food high in protein. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 103-112, 2017.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, Edinburgh, Vol. 26, Issue 2, pp. 211-252, 1964. (Series B - Methodological).

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa Nº 60, de 23 de dezembro de 2019c. Estabelece a lista de padrões microbiológicos para alimentos. **D. O. U. Brasília**, 2019 dez 26; Edição: 249; Seção 1. p. 133.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 272, de 14 de março de 2019a. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carne produtos cárneos. **D. O. U. Brasília**, 2019 Mar 18; Edição: 62; Seção 1. p. 194.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 331, de 23 de dezembro de 2019b. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **D. O. U. Brasília**, 2019 dez 26; Edição: 249; Seção 1. p. 96.

BRASIL. RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto 9.013, de 29 de março de 2017. **D.O.U. Brasília, 30 de março de 2017**. Edição: 62, Seção: 1, p. 3.

CHARMPI, C.; RECKEM, E. V.; SAMELI, N.; VAN DER VEKEN, D.; DE VUYST L.; LEROY, F. O uso de carnes menos convencionais ou carnes com pH alto pode levar ao crescimento de microrganismos indesejáveis durante a fermentação natural da carne. **Alimentos** , v. 9, n. 10, pág. 1386, 2020.

CHOI, H.; HWANG, B. K.; KIM, G. S.; CHOI, S. H. Influence of pathogen contamination on beef microbiota under different storage temperatures. **Food Research International** , v. 132, p. 109118, 2020.

CHRISTIEANS, S.; PICGIRARD, L.; PARAFITA, E.; LEBERT, A.; GREGORI, T. Impact of reducing nitrate/ nitrite levels on the behavior os *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* in French dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 137, p. 160-167, 2018.

CINTRA, A.P.R.; ANDRADE, M.C.G.; LAZARINI, M.M.; ASSIS, D.C.S.; SILVA, G.R.; MENEZES, L.D.M.; ORNELLAS, C.B.D.; FIGUEIREDO, T.C.; CANÇADO, S.V. Influence of cutting room temperature on the microbiological quality of chicken breast meat. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p. 814-820, 2016.

COLOMBO, S. G.; BACHINI, T. V.; SILVA, J. M.. Modelo de gestão para otimização do rendimento de envoltórios naturais na fabricação de linguiça suína tipo frescal. **Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção**, v. 4, n. 5, p. 124-139, 2016.

DE ANDRADE JÚNIOR, F. P.; DE MEDEIROS LIMA, B. T.; ALVES, T. W. B.; MENEZES, M. E. S. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 18, n. 1, p. 89-93, 2019.

DE MORAIS, E. J. F.; DE CARVALHO, C. V. F.; DE CARVALHO, C. W. B.; BARBOSA, F. R.; PEREIRA, D. E. Controle Microbiológico com Relação às Doenças Transmitidas Por Alimentos: um Estudo de Revisão Literária. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. 272, 2018.

DOMÍNGUEZ, R.; PATEIRO, M.; GAGAOUA, M.; BARBA, F. J.; ZHANG, W.; LORENZO, J. M. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat produtos. **Antioxidants** , v. 8, n. 10, pág. 429, 2019.

DUCIC, M.; KLISARA, N.; MARKOV, S.; BLAGOJEVIC, B.; VIDAKOVIC, A.; BUNCIC, S. The fate and pasteurization-based inactivation of *Escherichia coli* O157, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* in dry, fermented sausages. **Food Control**, v. 59, p. 400-406, 2016.

ED-DRA, A.; FILALI, F.R.; KARRAOUAN, B.; EL ALLAOU, A.; ABOULK, ACEM, A; BOUHRIF, B. Prevalence, molecular and antimicrobial resistance os

*Salmonella* isolated from sausages in Meknes, Marrocos. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 340-345, 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. Animal Production and health (2017). Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/home.html>. Acesso em: 10 ago. 2020.

FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M.; TORRES, E. A.; SILVA, J. F. M.. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

FIGUEIREDO, A. V. A.; RECINE, E.; MONTEIRO, R. Food risk regulation: the tensions of the Brazilian Health Surveillance System. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2353-2366, 2017.

FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products. **Meat Science**, p. 108272, 2020.

GEORGES, S. O.; BERNARDO, L. G., ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPO, M. R. H.; BORGES, L. J. Ecofisiologia microbiana e micro-organismos contaminantes de linguiça suína e de frango do tipo frescal. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 36, n. 1, 2019.

GIROT, J. M; MASSON, M. L; HARACEMIV, S. M. C. O uso de nitrato e nitrito em produtos cárneos e a formação de N-nitrosaminas. **Higiene alimentar**. p. 114-121, 2011.

GODFRAY, H. C. J.; AVEYARD, P.; GARNETT, T.; HALL, J. W.; TIMOTHY J. K; LORIMER, J.; PIERREHUMBERT, R. T.; SCARBOROUGH, P.; SPRINGMANN, M.; JEBB, S. A. Meat consumption, health, and the environment. **Science**, v. 361, n. 6399, 2018.

HA, J.; GWAK, E.; OH, M.; PARK, B.; LEE, J.; KIM, S.; LEE, H.; LEE, S.; YOON, Y.; CHOI, K-H. Kinetic behavior of *Salmonella* on low NaNO<sub>2</sub> sausages during aerobic and vacuum storage. . **Jornal coreano para ciência alimentar de recursos animais**, v. 36, n. 2, pág. 262, 2016.

HENTGES, D.; ZART, N.; MARMITT, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; ADAMI, F. S. Concentrações de nitrito e nitrato em salsichas. **Revista Brasileira em promoção da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 27-33, 2016.

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**. v. 78, p. 68-76, 2008.

JIN, S. K.; CHOI, J. S.; YANG, H. S.; PARK, T. S.; DONG-GYUN, H. Natural curing agents as nitrite alternatives and their effects on the physicochemical, microbiological properties and sensory evaluation of sausages during storage. **Meat Science**, v. 146, p. 34-40, 2018.

JUNG, S.; KIM, H. J.; PARK, S.; IN YONG, H.; CHOE, J. H.; JEON, H. J.; CHOE, W.; JO, C.. The use of atmospheric pressure plasma-treated water as a source of nitrite for emulsion-type sausage. **Meat Science**, v. 108, p. 132-137, 2015.

KIM, T. W.; KIM, C. W.; KNOW, S. G.; HWANG, J. H.; PARK D. H.; KANG, D. G.; HA J.; YANG, M. R; KIM, S. W; KIM, I. S. pH as analytical indicator for managing pork meat quality. **Sains malaysiana** , v. 45, n. 7, p. 1097-1103, 2016.

LI, X.; ZHANG, Y.; LI, Z.; LI, M.; LIU, Y.; ZHANG, D. The effect of temperature in the range of -0,8 to 4°C on lamb meat color stability. **Ciência da carne** , v. 134, p. 28-33, 2017.

LISTRAT, A.; LEBRET, B.; LOUVEAU, I.; ASTRUC, T.; BONNET, M.; LEFAUCHEUR L.; PICARD, B.; BUGEON, J. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. **The Scientific World Journal** , v. 2016, 2016.

MAPA - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. **D. O.U.** Brasília, 05 de abril de 2000. p.6.

MCLEOD, A.; MAGE, I.; HEIR, E.; AXELSSON, L. HOLCK, A. L . Effect of relevant environmental stresses on survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in dry-fermented sausage. **Jornal Internacional de Microbiologia Alimentar** , v. 229, p. 15 a 23 de 2016.

MEIRA, N. V.; HOLLEY, R.A.; BORDIN, K.; DE MACEDO, R. E.; LUCIANO, F. B. Combination os essential oil compounds and phenolic acids against *Escherichia coli* O157: H7 *in vitro* and in dry-fermented sausage production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 260, p. 59-64, 2017.

MERCIER, S.; VILLENEUVE, S.; MONDOR, M.; UYSAL I. Time-temperature management along the food cold chain: a review of recente developments. **Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 4, pág. 647-667, 2017.

MONTEIRO, G. M.; SOUZA, X. R.; COSTA, D. P. B.; FARIA, P. B.; VICENTE, J. Partial substitution of pork fat with canola oil in Toscana sausage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** , v. 44, p. 2-8 de 2017.

NERIN, C.; AZNAR, M.; CARRIZO, D. Food contamination during food process. **Tendências em ciência e tecnologia de alimentos**, v. 48, p. 63-68, 2016.

ORDONEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos de Origem Animal**. v. 2. São Paulo: Artmed, p. 279, 2005.

PATARATA, L.; NOVAIS, M.; FRAQUEZA, M. J.; SILVA, J. A. Inleunce of meat spoilage microbiota initial load on the growth and survival of three pathogens on a naturally fermented sausage. **Alimentos**, v. 9, n. 5, pág. 676, 2020.

PEGG, R.; SHAHIDI, F. Nitrite curing of meat. The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. 2004. **Blackwell Publishing**.

RESENDE FILHO, M. A.; DE SOUZA, K. J.; LIMA, L. C. F. Crises de segurança do alimento e a demanda por carnes no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 54, n. 3, p. 459-482, 2016.

ROSA, J. L.; BARROS, R. F.; SANTOS, M. O. Características da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, n. 1, p. 66-78, 2016.  
SAS Institute Inc. 2020. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SILVA, J. F. M.; FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

SOARES, K. M. P., SILVA, J. B. A. D., SOUZA, L. B. D., MENDES, C. G. D., ABRANTES, M. R., CAMPELO, M. C. D. S., & SOUZA, A. S. D. Qualidade microbiológica de carne bovina comercializada na forma de bife. **Rev. bras. ciênc. vet.**, p. 206-210, 2015.

SOARES, K. M. P.; DA SILVA, J. B. A.; DE GÓIS, V.A. Parâmetros de qualidade de carnes e produtos cárneos: UMA REVISÃO. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 268/269, 2017.

SONG, P.; WU, L.; GUAN, W. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: a meta-analysis. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 9872-9895, 2015.

TAPIA, M. S.; ALZAMORA, S. M.; CHIRIFE, J. Effects of water activity on microbial stability as a hurdle in food preservation. **Atividade da água em alimentos: fundamentos e aplicações**, p. 323-355, 2020.

WANG, Q.; WANG, J.; DING, W.; ZHANG, D.; REED, K.; ZHANG, B. Alternatives to carcinogenic preservatives in Chinese Sausage - Sorbic acid-loaded chitosan/tripolyphosphate nanoparticles **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 28-33, 2018.

XIONG, L. Y. The storage and preservation of meat: I - Thermal Technologies. In: **Lawrie's Meat Science**. Publicação Woodhead, 2017. p. 205-230.

## PARTE II – ARTIGO CIENTÍFICO

### INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE CURA NA AÇÃO DOS CONSERVANTES EM LINGUIÇAS FRESCAIS

SILVA, Rafaella<sup>1</sup>; PEREIRA JUNIOR, Oduvaldo Câmara Marques<sup>2</sup>;  
MUNHOZ, Patrícia Marques<sup>3</sup>

#### RESUMO

Considerada um alimento obtido de diversas etapas de manipulação e pouca tecnologia de transformação, a linguiça frescal tem potencial chance de envolvimento nos surtos de DTA. Neste sentido, a preservação faz-se necessária com o intuito de prolongar a vida útil do embutido por meio da adição de conservantes. Dentre estes, os mais utilizados constituem os sais de nitrito e nitrato. Entretanto, seu uso indiscriminado pode resultar em compostos nitrosos – subprodutos de caráter carcinogênico. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar o efeito do aumento da temperatura de descanso de massas de linguiças frescas de carne suína e o teor de nitrito/nitrato e perfil microbiológico, sendo as amostras coletadas de 04 lotes distintos em uma Fábrica de Embutidos localizada no município de Umuarama-Pr. Foram enviadas 04 repetições de 500 g de cada lote, totalizando 16 amostras, ao laboratório de análises de alimentos acreditado junto ao MAPA. Exclusivamente para realização do experimento, a massa de preparo foi previamente submetida a duas diferentes temperaturas de descanso/cura: refrigerada (0°C) e ambiente (25°C). Os resultados microbiológicos e físico-químicos obtidos demonstraram influência negativa do descanso de massa em temperatura ambiente quando comparado ao processo de cura em refrigeração, representados especialmente pela análise estatística de *Staphylococcus* coagulase positiva e nitrito, ambos  $p < 0,05$ .

**Palavras-chave:** Nitrito, Nitrato, *Salmonella* spp. *Staphylococcus*. *E. coli*.

#### INFLUENCE OF CURE TEMPERATURE IN THE ACTION OF CONSERVATIVES IN FRESH SAUCE

SILVA, Rafaella<sup>1</sup>; PEREIRA JUNIOR, Oduvaldo Câmara Marques<sup>2</sup>;  
MUNHOZ, Patrícia Marques<sup>3</sup>

#### ABSTRACT

Considered a food obtained from several stages of manipulation and little transformation technology, the fresh sausage has a potential chance of involvement in the outbreaks of ATD. In this sense, preservation is necessary in order to extend the life of the sausage through the addition of preservatives. Among these, the most used are the nitrite and nitrate salts. However, its indiscriminate use can result in nitrous compounds - by-products of a carcinogenic character. In this way, the present work sought to evaluate the effect of increasing the resting temperature of fresh pork sausages pasta and the nitrite / nitrate content and microbiological profile, with samples collected from 04 different batches in a Embutido Factory located in the municipality of Umuarama-Pr. 04 repetitions of 500 g of each batch, totaling 16 samples, were sent to the food analysis laboratory accredited by MAPA. Exclusively to perform the experiment, the preparation mass was previously subjected to two different resting / curing temperatures: refrigerated

(0°C) and room (25°C). The microbiological and physical-chemical results obtained demonstrated a negative influence of the mass rest at room temperature when compared to the refrigeration curing process, represented especially by the statistical analysis of positive coagulase and nitrite *Staphylococcus*, both  $p < 0.05$ .

**Keywords:** Nitrite. Nitrate. *Salmonella* spp. *Staphylococcus*. *E. coli*.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os derivados cárneos, a linguiça frescal configura parte da grande variedade de produtos processados, representando uma alternativa ao reaproveitamento de partes menos nobres. A seu favor tem-se ainda o relativo baixo custo de produção e a expressiva aceitação pelo mercado consumidor. Sua elaboração envolve diversas etapas de manipulação e sua formulação não é submetida a nenhum processamento tecnológico que promova a redução de microrganismos deteriorantes ou patogênicos mais encontrados nestes alimentos: *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli*. Em consequência, há possibilidades de surtos de DTAs resultante da contaminação em situações inadequadas de higiene do ambiente e manipuladores. Neste contexto, os processos e tecnologias de transformação contribuem para a preservação das características dos alimentos, sendo os conservantes tradicionalmente de destaque no processo de elaboração de linguiça frescal. Os sais de cura comumente utilizados no processo de fabricação de embutidos crus contemplam o nitrito e nitrato de sódio. Popularmente conhecido como “cura”, o recurso permite um controle da deterioração por microrganismos patogênicos. Por outro lado, o uso desses aditivos é legalmente restrito há décadas devido aos efeitos adversos cumulativos, principalmente relativos ao nitrito – subproduto da redução do nitrato, reação que ocorre tanto no organismo quanto nos alimentos. Seu efeito tóxico é causado pela formação endógena de compostos nitrosos como a N-nitrosodimetilamina e monometilnitrosamina (nitrosaminas e nitrosamidas) ambas de caráter carcinogênico, mutagênico e teratogênico. No Brasil, o Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por determinar o limite do teor residual de nitrito no produto cárneo final a ser consumido, regido por meio da RDC nº 272/2019. Esta estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Também regulamenta e permite a adição de sais de nitrito e nitrato de sódio até os valores máximos de 150 mg/Kg e 300 mg/Kg de produto, respectivamente. Desta forma, considerando-se a importância industrial e os efeitos toxicológicos deste aditivo, torna-se de relevância pública e sanitária o monitoramento dos níveis de nitrito e nitrato por meio das determinações quantitativas desses

compostos, visando a não exposição do consumidor a riscos à saúde, pois além de ser um problema direto àquele que consome, traz também problemas indiretos à sociedade: ausência no trabalho, maiores gastos do sistema público de saúde junto ao tratamento destas pessoas e redução da arrecadação fiscal – produtos não inspecionados geralmente são comercializados de forma clandestina, portanto, não recolhem impostos.

Neste sentido, o objetivo deste estudo será avaliar a correlação entre temperatura e o teor de nitrito e nitrato, bem como o perfil microbiológico em amostras de linguiças frescas de carne suína com duas temperaturas de cura distintas: ambiente (25°C) *versus* resfriada a 0°.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Elaboração das linguiças**

O experimento foi conduzido a partir de amostras de linguiças frescas de carne suína coletadas de 04 lotes distintos em uma Fábrica de Embutidos inscrita no Serviço de Inspeção Estadual do Paraná (SIP), localizada no município de Umuarama-Pr. Foram coletadas 04 repetições de 500 g de cada lote, totalizando 16 amostras (Figura 1).

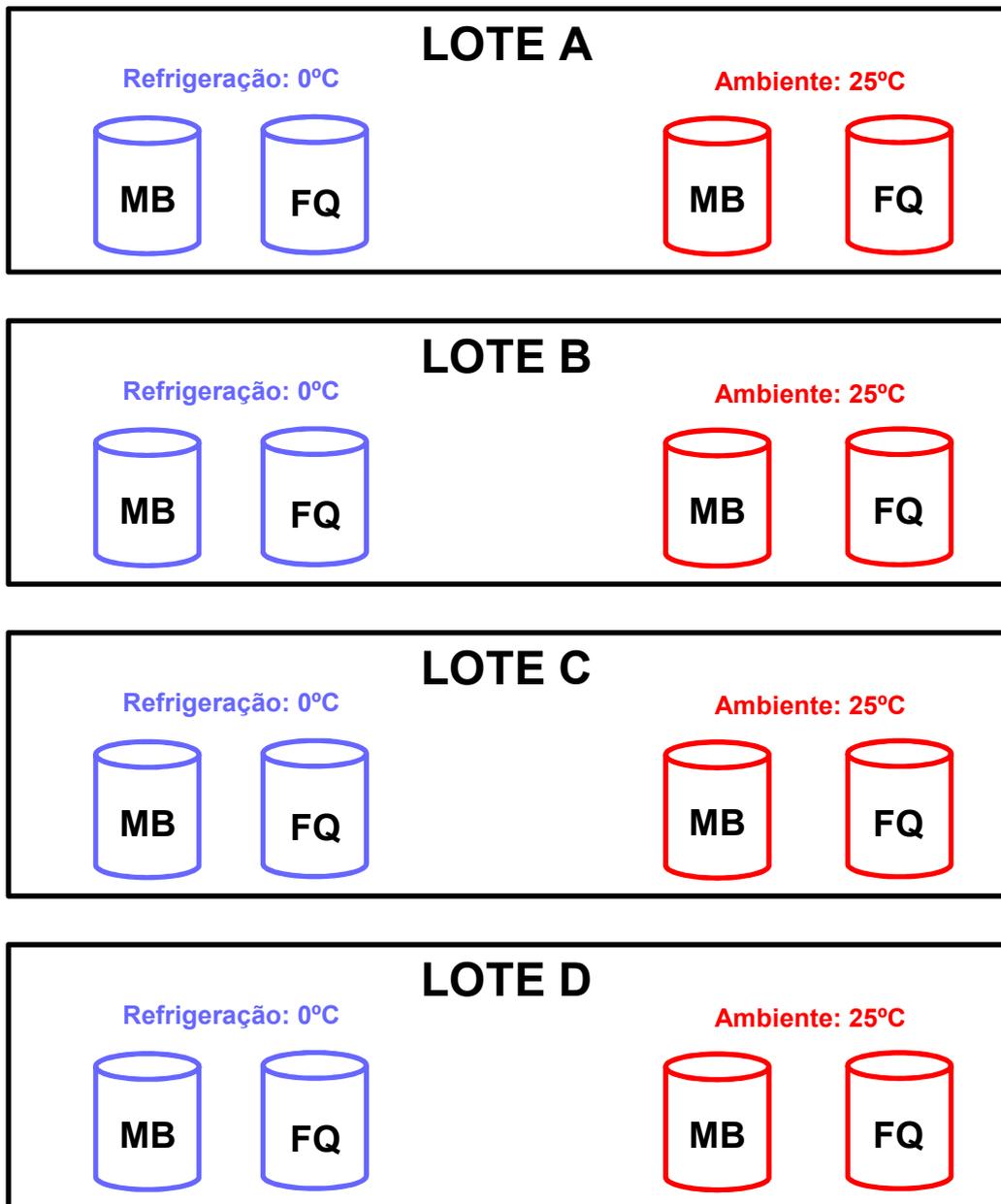
O processo de elaboração das linguiças frescas foi realizado de acordo com as normas de Boas Práticas e Fabricação (BPF) determinadas para estabelecimentos de manipulação de alimentos. Desta forma, as formulações e modo de preparo seguiram os padrões de qualidade registrados junto ao órgão fiscalizador, obedecendo a seguinte sequência de operações: moagem das carnes e gorduras; condimentação; cura (descanso de massa); embutimento e embalagem.

O processo de condimentação consistiu na adição de ingredientes junto à massa, seguida do emprego dos sais de cura compostos por: sal refinado (88%), nitrito (10%) e nitrato de sódio (2%).

Exclusivamente para realização do experimento, a massa de preparo foi separada em duas partes iguais: uma parte submetida ao processo de cura em refrigeração (0°C) e o restante, a ação dos sais de cura ocorreu em temperatura ambiente (25°C), ambos pelo tempo de 12 horas.

As linguiças foram enviadas sob refrigeração para transporte até o laboratório de análises de alimentos credenciado junto ao MAPA.

**Figura 1:** Ilustração das quatro repetições coletadas de cada lote em que metade foram descansadas em temperatura de refrigeração (0°C) e o restante, em temperatura ambiente (25°C).



MB: Microbiológico/ FQ: físico-químico

Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

## 2.2 Metodologia dos ensaios microbiológicos e físico-químicos

As análises de quantificação dos teores de nitrato e nitrito foram realizadas de acordo com a metodologia NMKL 194:2013 – “*Nitrate and Nitrite - Determination of nitrate and nitrite in food stuffs and water spectrophotometric after zinc reduction and griess reaction*”. Trata-se do método de maior reconhecimento e relevância para o

doseamento de nitrato e nitrito mediante espectrofotometria, baseado na reação de Johann Peter Griess (1829-1888).

Os ensaios microbiológicos foram realizados com diferentes metodologias de acordo com cada microrganismo, sendo:

- Contagem de *Escherichia coli*: técnica de inoculação em superfície pelo método AOAC 998.08;
- Pesquisa de *Salmonella* spp.: técnica de ensaio para detecção molecular pelo método AFNOR Validation 3M 01/16 - 11/16 3M;
- Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva: técnica de inoculação em superfície pelo método ISSO 6888-1

### 2.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se o programa computacional SAS - versão *SAS University Edition* (SAS INSTITUTE INC. 2020).

Realizando-se primeiramente uma análise exploratória dos dados, foi verificada que a pressuposição de normalidade não foi atendida para o parâmetro *Coliformes termotolerantes* (Coliformes). Deste modo, foi necessário transformar os dados originais pelo logarítmico na base 10 ( $\log_{10}$ ) através da potência ótima de Box;Cox (1964), assim:  $\text{Coliformes}_T = \log_{10} \text{Coliformes}$ . A fim de analisar os parâmetros mensurados (*E. coli*, *Staphylococcus*, nitrito e nitrato) nas amostras, foi realizada análise de variância (Anova) que incluiu o efeito de temperatura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) através da Proc Anova do SAS. Em seguida, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, sendo que o modelo ficou definido como:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Temp}_i + e_{ij}, \text{ onde:}$$

$Y_{ij}$  = i-ésima Observação na j-ésima Temperatura;

$\mu$  = estimativa de média geral;

$\text{Temp}_j$  = efeito da j-ésima Temperatura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C);

$e_{ij}$  = erro aleatório inerente a cada observação  $\sim \text{NID}(0, \sigma^2_e)$ .

Em virtude dos resultados obtidos para *Salmonella* spp serem idênticos para todas as amostras, não foi necessário realizar inferência estatística para a mesma.

Os testes foram realizados com  $P < 0,05$ , ou seja, com nível de significância de 5%.

Tabela 1: Tabela de Resultados e Análise de Variância					
Variável	Modelo	Nível Signif.	N	Resultado -Temperatura (Pr > F)	
<i>E.coli</i>	= Temperatura	5%	16	0,5640 Não Signif.	
<i>Staphylococcus</i>	= Temperatura	5%	16	0,0029 Significativo	
Nitrito	= Temperatura	5%	16	0,0304 Significativo	
Nitrato	= Temperatura	5%	16	0,2605 Não Signif.	
<p>➤ Os resultados destacados em verde são significativos a 5%, ou seja, as médias são diferentes para o efeito de temperatura (0° e ambiente).</p> <p>➤ Os valores destacados em laranja não são significativos a 5%, ou seja, as médias não são diferentes para o efeito de temperatura (0° e ambiente).</p>					

Fonte: Arquivo Pessoal, 2021.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Dentre os alimentos da dieta humana, a carne destaca-se por seu elevado perfil nutritivo, representando a principal fonte de proteína de alto valor biológico (SOARES *et al.*, 2017). Indicativos históricos mostram que o consumo de carne não é recente. Dados científicos demonstram que a evolução do homem moderno propiciou um aumento no consumo de produtos de origem animal equivalente a 80% da energia de sua dieta quando comparada a de cerca de 50.000 anos atrás (GODFRAY *et al.*, 2018).

Entretanto, a constituição intrínseca da carne favorece o processo de degradação microbiológica devido à presença considerável de água (42%), proteína (12%) e gordura (45%) (ORDONEZ, 2005; LISTRAT *et al.*, 2016). Seu pH tende a manter próximo a neutralidade e, imediatamente após a morte do animal, a quantidade normal de glicogênio presente no músculo (1%) é convertida em ácido lático promovendo a redução do pH de aproximadamente 7,4 para 5,6 (CHARMPI *et al.*, 2020). Portanto, o pH influencia não somente na microbiota que pode se desenvolver, mas também no estado de conservação do produto (KIM *et al.*, 2016). Soma-se a isto o fato de que a condição de armazenamento do alimento tem influência direta em seu tempo de vida útil (XIONG, 2017). Daí a importância deste subproduto ser acondicionado em ambientes higiênicos e sob refrigeração adequada (LI *et al.*, 2017), sendo fundamental o monitoramento da temperatura do mesmo ao longo de todo processo (GEORGES *et al.*, 2019). Neste cenário, os microrganismos (patogênicos ou deteriorantes) tais como *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli* dispõem de meios

propícios para o desenvolvimento e podem estar presentes no produto final (ARKON *et al.*, 2017) tornando-o um risco potencial na causa de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (DE MORAIS *et al.*, 2018).

Diante disto, a população tem buscado, desde a antiguidade, preservar as características dos alimentos através de processos e tecnologias de transformação. A crescente demanda pelos consumidores resultou na elaboração de produtos diversificados advindos de produtos a base de carnes e vísceras bovinas, suínas e de aves (RESENDE FILHO; DE SOUZA; LIMA, 2016). Neste contexto, a linguiça frescal configura parte da grande variedade de derivados cárneos, dentre os produtos processados, representando uma alternativa ao reaproveitamento de partes menos nobres. A seu favor tem-se ainda o relativo baixo custo de produção e a expressiva aceitação pelo mercado consumidor (BEZERRA *et al.*, 2012).

Por se tratar de um alimento com grandes variações na fabricação e matéria prima, as legislações regulamentam os requisitos básicos e características para os diferentes tipos de produtos processados. Sendo assim, o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) define linguiça como “o produto cárneo obtido de carnes cominuídas das diferentes espécies animais, condimentado, com adição ou não de ingredientes, embutido em envoltório natural ou artificial e submetido a processo tecnológico específico” (BRASIL, 2017). A linguiça frescal, de acordo com Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000, se caracteriza por ser um produto cru e curado, de carne, gordura e outros ingredientes. As características físico-químicas da linguiça frescal regida pela mesma legislação estabelece: 70% de umidade máxima, 30% de gordura, 0,1% de cálcio (base seca) e no mínimo, 12% de proteína sendo proibida a adição de carne mecanicamente separada (CMS) (MAPA, 2000). A normativa tem por objetivo criar condições de igualdade e transparência na produção de linguiças, fixando suas características em relação aos padrões oficiais exigidos (MAPA, 2000).

Além disso, embora haja diversas etapas de manipulação durante a produção de linguiças frescas, importa salientar que sua formulação não é submetida a nenhum processamento tecnológico que promova a redução de microrganismos deteriorantes ou patogênicos (MONTEIRO *et al.*, 2017). Em consequência, há possibilidades de surtos de DTAs resultante da contaminação em situações inadequadas de higiene do ambiente e manipuladores (RESENDE FILHO; DE SOUZA; LIMA, 2016). Dentre os principais microrganismos implicados em tais surtos, os estafilococos coagulase positiva (ECP)

são bactérias que produzem coagulase livre. O patógeno é elemento importante na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica, e é transmitido aos alimentos especialmente pelo homem e por condições inadequadas de higiene, além da ocorrência de contaminação cruzada entre equipamentos, utensílios e matéria prima (SILVA; FEITOSA; RODRIGUES, 2017). Tratam-se de bactérias potencialmente produtoras de enterotoxinas, conferindo características de risco atreladas a contaminação (DE ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2019).

Entre os problemas mais alarmantes de saúde pública em todo mundo, as doenças causadas por *Salmonella* spp., e transmitidas por alimentos, também apresentam risco em potencial para o consumidor (ED-DRA, *et al.*, 2017). Este microrganismo possui atualmente mais de 2600 sorotipos, e dentre as de maior importância para a saúde humana estão a *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar *Typhi*, causadora de infecções sistêmicas e febre tifoide, e a *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar *Typhimurium*, agente causador de gastroenterites (CHRISTIEANS, *et al.*, 2018). A IN nº 60/ 2019 e RDC nº 331/ 2019 preconizam como requisito microbiológico único para carnes de aves, bovina, suína e outras, sendo cruas ou não, a ausência de *Salmonella* em 25 g, independente do sorotipo (BRASIL, 2019b; BRASIL, 2019c).

Outro microrganismo de relevância e responsável pela recolha de produtos alimentícios é a *Escherichia coli*. Trata-se de uma bactéria bacilar Gram negativa, encontrada no trato gastrointestinal inferior dos organismos de sangue quente (endotérmicos), e sua presença em água ou alimentos é indicativo de contaminação fecal (DUCIC *et al.*, 2016). Embora a maioria das estirpes sejam inofensivas, alguns sorotipos podem causar graves intoxicações alimentares nos seres humanos (CHRISTIEANS *et al.*, 2018), constituindo causa importante nos quadros de gastroenterites, como é o caso da *Escherichia coli* O157:H7, causadora de colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica. Esta, atrelada à baixa dose de infecção e a gravidade da doença, representa uma preocupação frente a saúde pública (ROSA; BARROS; SANTOS, 2016).

Soma-se a isto ainda a microbiota natural do animal (CHOI *et al.*, 2020) e outras prováveis fontes de contaminação, tais como os envoltórios (COLOMBO; BACHINI; SILVA, 2016), condimentos, e até mesmo a água utilizada em todo o processo de fabricação do produto em si (ADAMI *et al.*, 2015a).

Segundo Tapia, Alzamora e Chirife (2020), a ausência de processamento térmico ou dessecação, somado a alta atividade de água, influenciam no curto prazo comercial

do produto. Isso porque a qualidade microbiológica do produto final resulta da ausência, ou baixos níveis, de contaminação da matéria prima e demais ingredientes adicionados à formulação.

Neste contexto, os processos e tecnologias de transformação contribuem para a preservação das características dos alimentos, sendo os conservantes tradicionalmente de destaque no processo de elaboração de linguiça frescal. Os sais de cura comumente utilizados no processo de fabricação de embutidos crus contemplam o nitrito e nitrato de sódio (JUNG, S. *et al.*, 2015). Popularmente conhecido como “cura”, o recurso permite um controle da deterioração por microrganismos patogênicos (JIN, S. K *et al.*, 2018). Adami *et al.*, (2015b) relataram que os sais de nitrito e nitrato são empregados como aditivos alimentares para a prevenção da proliferação de esporos – importantes causadores de graves alterações nos produtos cárneos, com repercussão na saúde humana. Além disso, a literatura comprova que tais conservantes possibilitam o alcance aos parâmetros característicos de qualidade sensorial, maximizando cor, sabor, aroma e textura (HONIKEL, 2008), permitindo a oferta de variações no material cru, nas formulações e diferenças em processos e técnicas aplicadas. Outro relato científico constatou também, além da conferência de cor e sabor característicos de carne curada pelos sais nitrito e nitrato, uma significativa inibição da oxidação lipídica de linguiças frescas, aumentando assim o tempo de conservação do produto (DOMINGUES *et al.*, 2019).

Por outro lado, o uso desses aditivos é legalmente restrito há décadas devido aos efeitos adversos cumulativos, principalmente relativos ao nitrito – subproduto da redução do nitrato, reação que ocorre tanto no organismo quanto nos alimentos (PEGG; SHAHIDI, 2004; GIROT, MASSON e HARACEMIV, 2011). Seu efeito tóxico é causado pela formação endógena de compostos nitrosos como a N-nitrosodimetilamina e monometilnitrosamina (nitrosaminas e nitrosamidas) ambas de caráter carcinogênico, mutagênico e teratogênico (WANG *et al.*, 2018). Ademais, quando ingeridos em excesso, os nitritos unem-se irreversivelmente à hemoglobina e originam um quadro de hemoglobinemia, também conhecido por “Síndrome do Bebê Azul”. Isto porque quando o nitrito encontra-se presente no organismo, principalmente de crianças, causa oxidação da hemoglobina acarretando em efeitos nocivos, dentre eles o menor aporte de oxigênio para o corpo. Tal doença pode levar a anoxia e morte (HENTGES *et al.*, 2016). Deste modo, tem-se que os nitratos são relativamente pouco tóxicos para os seres humanos,

mas a sua toxicidade e relevância neste sentido está atribuída principalmente à sua redução a nitrito (WANG *et al.*, 2018).

A preocupação frente à presença de nitrosaminas nos alimentos ocorre desde 1968, quando pesquisas realizadas pela agência estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA) foram iniciadas com intuito de se reduzir os níveis de nitrosaminas e encontrar substitutos para o nitrito como conservante alimentar. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por determinar o limite do teor residual de nitrito no produto cárneo final a ser consumido, regido por meio da RDC nº 272/2019. Esta estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Também regulamenta e permite a adição de sais de nitrito e nitrato de sódio até os valores máximos de 150 mg/Kg e 300 mg/Kg de produto, respectivamente (BRASIL, 2019a).

Apesar da legislação vigente, embutidos oriundos de produção artesanal ou de marcas desconhecidas e desprovidas de qualquer fiscalização de ordem sanitária, podem apresentar desconformidades em relação aos padrões oficiais. Tais irregularidades versam especialmente no descumprimento relacionado ao limite máximo para nitrito nestes produtos. Sua oferta indiscriminada acaba por expor os consumidores a riscos inerentes à ingestão de alimentos processados em condições precárias e/ou irregulares, em especial aos aditivos empregados e suas quantidades excessivas (FLORES; TOLDRÁ, 2020).

Desta forma, considerando-se a importância industrial e os efeitos toxicológicos deste aditivo, torna-se de relevância pública e sanitária o monitoramento dos níveis de nitrito e nitrato por meio das determinações quantitativas desses compostos, visando a não exposição do consumidor a riscos à saúde, pois além de ser um problema direto àquele que consome, traz também problemas indiretos à sociedade: ausência no trabalho, maiores gastos do sistema público de saúde junto ao tratamento destas pessoas e redução da arrecadação fiscal – produtos não inspecionados geralmente são comercializados de forma clandestina, portanto, não recolhem impostos.

Neste sentido, o objetivo deste estudo será avaliar a correlação entre temperatura e o teor de nitrito e nitrato, bem como o perfil microbiológico em amostras de linguças frescas de carne suína com duas temperaturas de cura distintas: ambiente (25°C) *versus* resfriada a 0°.

## 4. ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 4.1 Ensaio microbiológicos

A análise das amostras para o desenvolvimento microbiológico de *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella spp.*, em duas diferentes temperaturas de descanso de massa: 0°C e ambiente (25°C), apresentou os resultados descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Resultados microbiológicos de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C)

Patógeno	LOTE A		LOTE B		LOTE C		LOTE D	
	0°C	AMBIENTE	0°C	AMBIENTE	0°C	AMBIENTE	0°C	AMBIENTE
<i>Salmonella spp</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>E. coli</i> (UFC / g)	4,7 x 10 <sup>1</sup>	7,0 x 10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>2</sup>	1,0 x 10 <sup>1</sup>	5,3 x 10 <sup>1</sup>	<1,0 x 10 <sup>1</sup>	2,1 x 10 <sup>2</sup>
<i>S. coag. positiva</i> (UFC / g)	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	1,9 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	2,2 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	2,9 x 10 <sup>1</sup>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup>	1,8 x 10 <sup>1</sup>

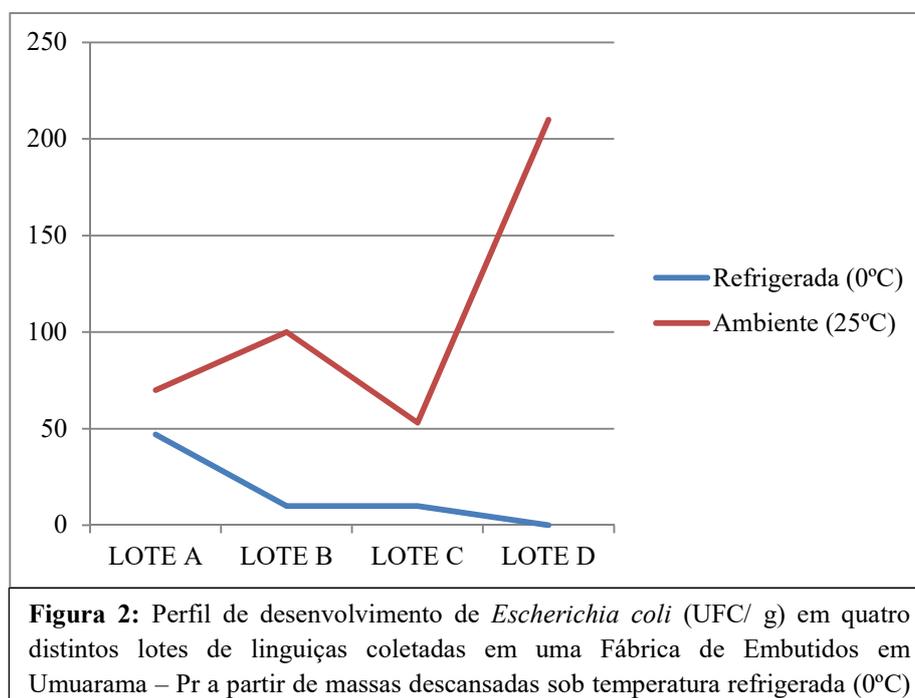
Fonte: Levantamento de dados, 2021.

#### 4.1.1 *Escherichia coli*

**Tabela 3:** Resultados microbiológicos (*E. coli*) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).

	Refrigerada (0°C)	Ambiente (25°C)
<b>LOTE A</b>	4,7 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	7,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE B</b>	1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	1,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/ g
<b>LOTE C</b>	1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	5,3 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE D</b>	<1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	2,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/ g

Fonte: Levantamento de dados, 2021.

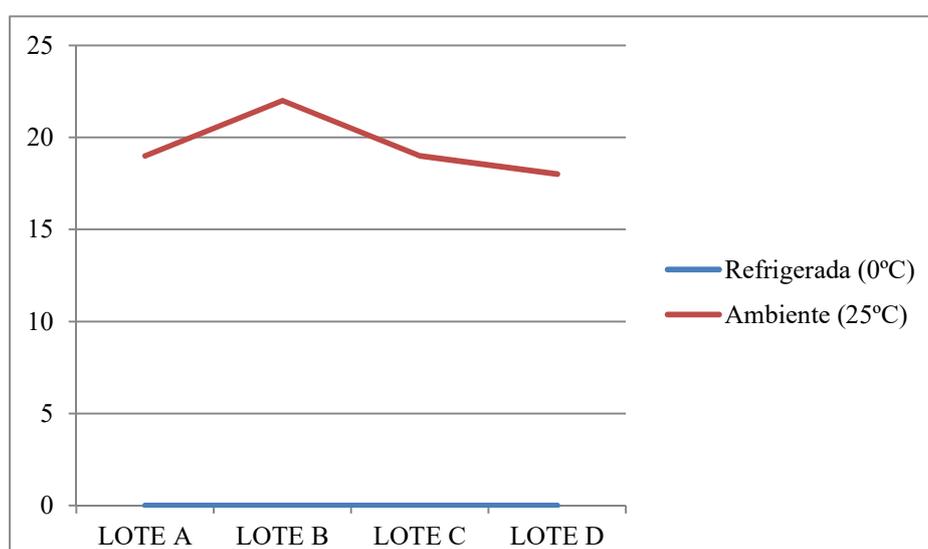


#### 4.1.2 – *Staphylococcus coagulase positiva*

**Tabela 4:** Resultados microbiológicos (*S. coag. positiva*) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).

	Refrigerada (0°C)	Ambiente (25°C)
<b>LOTE A</b>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	1,9 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE B</b>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	2,2 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE C</b>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	2,9 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g
<b>LOTE D</b>	< 1,0 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g	1,8 x 10 <sup>1</sup> UFC/ g

Fonte: Levantamento de dados, 2021.



**Figura 3:** Perfil de desenvolvimento de *Staphylococcus coagulase positiva* (UFC/ g) em quatro distintos lotes de linguiças coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama – Pr a partir de massas descansadas sob temperatura refrigerada (0°C)

Fonte: Levantamento de dados, 2021.

### 4.1.3 – *Salmonella* spp

**Tabela 5:** Resultados microbiológicos (*Salmonella* spp) de linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Embutidos em Umuarama-Pr a partir de massas submetidas a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C) representado em logaritmo 10 (log 10).

	Refrigerada (0°C)	Ambiente (25°C)
<b>LOTE A</b>	Ausente/ 25 g	Ausente/ 25 g
<b>LOTE B</b>	Ausente/ 25 g	Ausente/ 25 g
<b>LOTE C</b>	Ausente/ 25 g	Ausente/ 25 g
<b>LOTE D</b>	Ausente/ 25 g	Ausente/ 25 g

Fonte: Levantamento de dados, 2021.

As amostras submetidas ao descanso de massa sob temperatura ambiente (25°C) obtiveram crescimento significativo ( $p < 0,05$ ) no que diz respeito ao perfil microbiológico de *Staphylococcus* coagulase positiva quando comparadas às formulações descansadas sob refrigeração (0°C). Já o desenvolvimento de *E. coli*, embora o efeito temperatura elevasse a curva de crescimento (Figura 2), não houve resultados significativos ( $p > 0,05$ ) conforme representado em análise estatística (Tabela 1). Para *Salmonella* spp., foi constatada ausência de unidades formadoras de colônias em todos os lotes analisados.

Neste cenário, De Andrade *et al.*, (2019) consideram a temperatura de acondicionamento de linguiças um agravante para a segurança deste, uma vez que contaminado por estafilococos, o alimento pode conter enterotoxinas estafilocócicas resultando em graves quadros de intoxicação alimentar ao consumidor. No presente estudo os resultados para crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva mostraram-se inferiores ao valor considerado capaz de provocar intoxicação: 106 UFC/ g de alimento (BARBOSA *et al.*, 2014). Mesmo as amostras analisadas não apresentando risco para intoxicações, observou-se influência da temperatura de descanso de massa a 25°C (ambiente), sendo o perfil de desenvolvimento obtido na faixa de 18 a 21 UFC/ g em comparação ao descanso a 0°C, quando a contagem indicou  $< 10$  UFC/ g. Por se tratar de microrganismos mesófilos, sua temperatura ideal de crescimento varia entre 7 e 47,8°C (FEITOSA *et al.*, 2017). Além da temperatura, a carga microbiológica da matéria prima é considerada outro fator de influência ao desenvolvimento de patógenos no produto final. Patarata *et al.*, (2020), demonstraram que a redução da contaminação na carne crua é fator favorável contra a multiplicação de microrganismos, entre ele a

*Staphylococcus aureus*, espécie pertencente a classificação de estafilococos coagulase positiva. Ao observar o comportamento da *Escherichia coli* no presente estudo, notou-se que o desenvolvimento de colônias em linguiças formuladas com massas submetidas ao descanso ambiente (25°C) foi de 70 UFC/ g e ultrapassou a quantidade estimada capaz de conferir doenças graves, já que segundo Meira *et al.*, (2017) menos de 50 organismos por grama de alimento pode promover quadros de diarreia com sangue, síndrome hemolítico-urêmica e insuficiência renal aguda ao homem quando ingeridos alimentos infectados com baixa dose. Neste sentido, as infecções causadas pelo patógeno consistem em ameaça global para a segurança alimentar, agravadas pelo fato de que outros surtos graves com manifestações enterohemorrágica têm sido decorrentes da capacidade dos patógenos utilizarem respostas adaptativas a diferentes condições estressantes, podendo aumentar sua sobrevivência. Tal fato pode ser observado por McLeod *et al.*, (2016) ao induzirem um estresse em massas contendo níveis aumentados de NaCl, sendo a sobrevivência da *E. coli* registrada em duas temperaturas (20°C e 30°C). Com o intuito de levar a uma maior resistência ao estresse aplicado, demonstraram a capacidade de adaptação da *E. coli* ao sal e temperaturas médias. Na busca de produtos seguros, estudos têm sido desenvolvidos para reduzir a carga microbiana após processamento. Ducic *et al.*, (2016) confirmaram que, ao utilizar pasteurização em linguiças acabadas de porco, foi possível eliminar *E. coli* O157, ainda preservando-se a qualidade sensorial aceitável do produto acabado. No presente estudo não houve presença de *Salmonella* spp. nas amostras dos diferentes lotes submetidos tanto a temperaturas de descanso de massa refrigerada (0°C) quanto ambiente (25°C). O resultado satisfaz a legislação brasileira regulamentada pela Instrução Normativa nº 60/2019, a qual prevê como aceitável a ausência de *Salmonella* spp em 25 g de alimento. O mesmo não foi observado por ED-DRA *et al.* (2017), os quais detectaram *Salmonella* spp em 21% das amostras avaliadas, sendo a maior prevalência em linguiças vendidas em camelôs (30,55%), seguidas de açougue (18,05%) e supermercado (12,5%). Nota-se que alguns estudos avaliam diferentes concentrações de nitrito de sódio e o seu efeito. HA *et al.*, (2016) avaliaram o crescimento de *Salmonella* spp em linguiças formulada com diferentes teores de cloreto de sódio (NaCl) e baixo nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>), seguido de armazenamento aeróbio ou a vácuo a 10°C e 15°C para até 816 h ou 480 h, respectivamente. O resultado obtido indicou que apenas 10 ppm de NaNO<sub>2</sub> pode aumentar o crescimento de *Salmonella* em baixas concentrações de NaCl, e que o NaCl

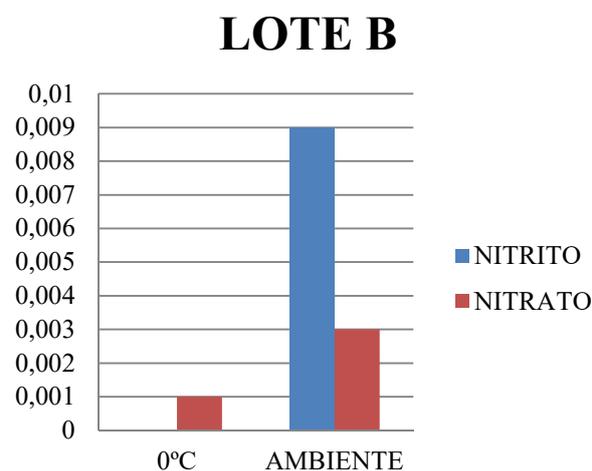
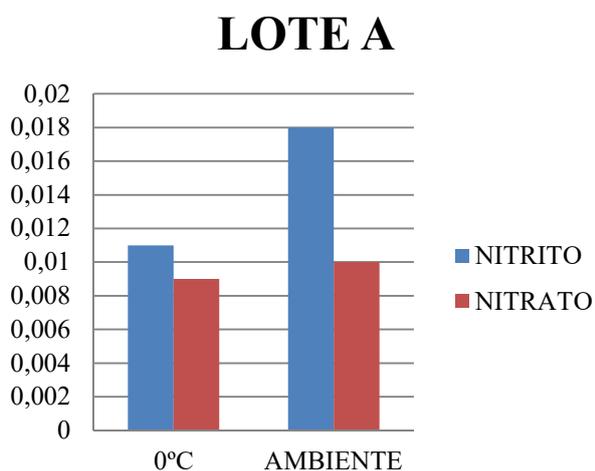
desempenha papel importante na inibição do crescimento de *Salmonella* em salsichas com baixo NaNO<sub>2</sub>.

#### 4.2 Ensaios físico-químicos

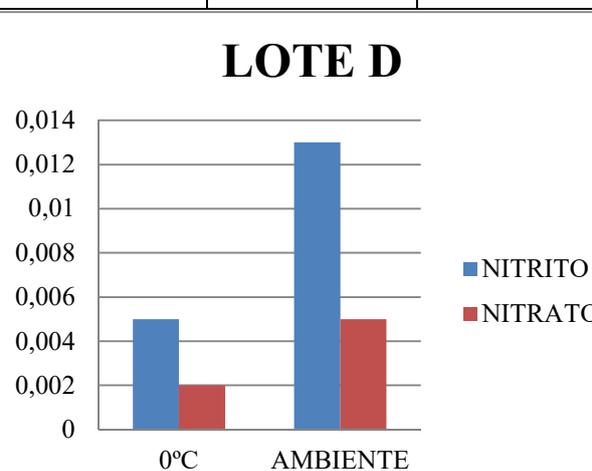
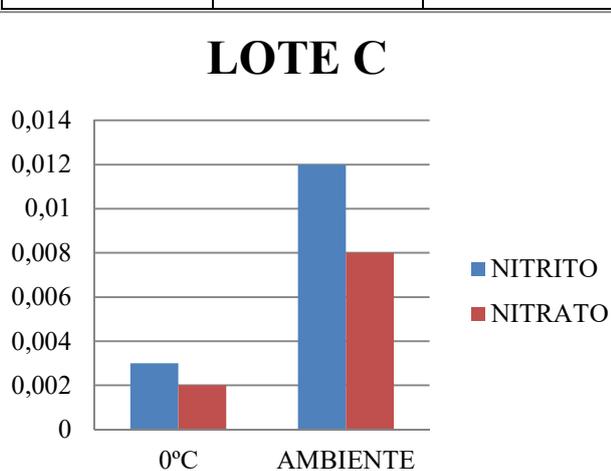
Na tabela 6 estão os resultados obtidos na análise das amostras para a quantificação de nitrito e nitrato em duas diferentes temperaturas de descanso de massa: refrigerada (0°C) e ambiente (25°C).

**Tabela 6:** Resultados físico-químicos para quantificação de nitrito e nitrato em linguiças frescas de carne suína coletadas em uma Fábrica de Conservas em Umuarama-Pr a partir de massas submetida a duas diferentes temperaturas de cura (refrigerada: 0°C e ambiente: 25°C)

LOTE A			LOTE B		
	0°C	AMBIENTE		0°C	AMBIENTE
<b>NITRITO</b>	0,011	0,018	<b>NITRITO</b>	<0,002	0,009
<b>NITRATO</b>	0,009	0,01	<b>NITRATO</b>	0,001	0,003



LOTE C			LOTE D		
	0°C	AMBIENTE		0°C	AMBIENTE
<b>NITRITO</b>	0,003	0,012	<b>NITRITO</b>	0,005	0,013
<b>NITRATO</b>	0,002	0,008	<b>NITRATO</b>	0,002	0,005



No ano de 2019, a ANVISA decidiu pela revogação da RDC nº 12, a qual regulamentava os padrões microbiológicos para alimentos desde 2001 (ANVISA, 2001). Desta forma, os novos padrões bem como sua aplicação foram definidos pela RDC nº 331/ 2019. Associado a isto, a autoridade sanitária optou por incluir uma lista de padrões microbiológicos para alimentos sob o anexo de uma Instrução Normativa (IN nº 60/2019), no intuito de otimizar as atualizações e/ou correções já que o trâmite se torna mais ágil quando ocorre por meio de IN. A principal alteração refere-se ao plano de amostragem que poderá ser adotado pelos setores envolvidos na cadeia produtiva de alimento, visto que a autoridade sanitária permitiu que a empresa elaborasse seu próprio plano amostral de acordo com os parâmetros determinados pela nova instrução (BRASIL, 2019b; BRASIL, 2019c). Neste caso, para os microrganismos de interesse no presente estudo compreendem as seguintes determinações (Tabela 7):

**Tabela 7:** Lista de padrões microbiológicos para alimentos segundo IN n. 60/ 2019 (ANVISA) para determinação da qualidade do produto final.

<b>Categorias Específicas</b>	<b>Microrganismos</b>	<b>n</b>	<b>c</b>	<b>m</b>	<b>M</b>
c) Embutidos crus (linguiças frescas)	<i>Salmonella</i> / 25 g, para carne suína	5	0	Aus	-
	<i>Escherichia coli</i> / g, para carne suína	5	3	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
	Aeróbios mesófilos/ g	5	3	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>

**N:** número de unidades amostrais coletadas aleatoriamente/ **c:** qualidade intermediária (tolerada)/ **m:** limite mínimo/ **M:** limite máximo

Fonte: IN n.60/ 2019 (ANVISA)

A partir dessas informações, observa-se que neste experimento as amostras encontram-se dentro dos parâmetros aceitáveis de qualidade para o perfil microbiológico, levando-se em conta que o desenvolvimento para *Escherichia coli* não ultrapassou 210 UFC/ g (Tabela 3) , *Staphylococcus* coagulase positiva não ultrapassou 22 UFC/ g (Tabela 4) e para *Salmonella* spp. foi ausente (Tabela 5).

O perfil físico-químico das amostras analisadas demonstrou aumento no teor de nitrito e nitrato em formulações de massas submetidas ao descanso em temperatura ambiente (25°C) em todos os lotes. Ao observar a legislação brasileira vigente, tem-se o estabelecimento do limite na adição de nitrato aos produtos cárneos não cozidos através da RDC nº 272/ 2019 (ANVISA) na ordem de 0,03 g/ 100 g do produto (300 ppm) e nitrito de sódio, 0,015 g/ 100 g (150 ppm) (BRASIL, 2019a). Deste modo, os lotes B, C e D são consideradas “amostras ideal” ao consumo humano. O mesmo não ocorre para o lote A, o qual demonstrou resultado expressivo em 0,018 g/ 100. Adami *et al.*, 2015b verificaram que 54,5% das amostras de linguiças produzidas em estabelecimento fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Sanitária Municipal (SIM) apresentaram nitrito

acima do permitido e 100% das amostras apresentaram nitrato acima do permitido em pelo menos um dos lotes analisados.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo demonstrou influência negativa do descanso de massa submetido à temperatura ambiente (25°C) em todos os lotes de linguiças frescas de carne suína analisados, observado através do crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli*, e pela quantificação de nitrito e nitrato, de maneira que a manutenção do frio ao longo da cadeia produtiva interfere na qualidade do produto final.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMI, F. S.; DAL BOSCO, S. M.; ALTENHOFEN, G.; DE SOUZA, C. F. V.; OLIVEIRA, E. C. Avaliação da qualidade microbiológica de linguiças e queijos. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 12, n. 1, 2015a.
- ADAMI, F.S.; GIOVANAZ, L. S.; ALTENHOFEN, G.; DAL BOSCO, S. M.; MACADENTRI, A.; OLIVEIRA, E. C. Análise microbiológica e de nitrito e nitrato em linguiça. **Scientia plena**, v. 11, n. 5, 2015b.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **D. O. U. Brasília**, 2001 Jan 07.
- ARKOUN, M.; DAIGLE, F.; HEUZEY, M.C.; AJJI, A. Mechanism of action of eletrospun chitosan-based nanofibres against meat spoilage and pathogenic bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 4, pág. 585, 2017.
- BARBOSA, L. G.; MADEIRA JÚNIOR, R.; MARTINS, A. D. O.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, C. T. Avaliação de estafilococos coagulase positiva em uma unidade de alimentação pública do estado de Minas Gerais. **Revista Científica da Faminas**, v. 10, n. 1, 2014.
- BEZERRA, M. V. P.; ABRANTES, M. R.; SILVESTRE, M. K. S.; SOUSA, E. S.; ROCHA, M. O. C.; FAUSTINO, J. G.; SILVA, J. B. A. Avaliação microbiológica e físico química de linguiça toscana no município de Mossoró, RN. **Arq Inst Biol**, v. 79, n. 2, p. 297-300, 2012.
- BOHRER, B. M. Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat food high in protein. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 103-112, 2017.
- BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, Edinburgh, Vol. 26, Issue 2, pp. 211-252, 1964. (Series B - Methodological).
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa Nº 60, de 23 de dezembro de 2019c. Estabelece a lista de padrões microbiológicos para alimentos. **D. O. U. Brasília**, 2019 dez 26; Edição: 249; Seção 1. p. 133.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 272, de 14 de março de 2019a. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carne produtos cárneos. **D. O. U. Brasília**, 2019 Mar 18; Edição: 62; Seção 1. p. 194.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº 331, de 23 de dezembro de 2019b. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **D. O. U. Brasília**, 2019 dez 26; Edição: 249; Seção 1. p. 96.

BRASIL. RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto 9.013, de 29 de março de 2017. **D.O.U. Brasília, 30 de março de 2017**. Edição: 62, Seção: 1, p. 3.

CHARMPI, C.; RECKEM, E. V.; SAMELI, N.; VAN DER VEKEN, D.; DE VUYST L.; LEROY, F. O uso de carnes menos convencionais ou carnes com pH alto pode levar ao crescimento de microrganismos indesejáveis durante a fermentação natural da carne. **Alimentos**, v. 9, n. 10, pág. 1386, 2020.

CHOI, H.; HWANG, B. K.; KIM, G. S.; CHOI, S. H. Influence of pathogen contamination on beef microbiota under different storage temperatures. **Food Research International**, v. 132, p. 109118, 2020.

CHRISTIEANS, S.; PICGIRARD, L.; PARAFITA, E.; LEBERT, A.; GREGORI, T. Impact of reducing nitrate/ nitrite levels on the behavior os *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes* in French dry fermented sausages. **Meat Science**, v. 137, p. 160-167, 2018.

COLOMBO, S. G.; BACHINI, T. V.; SILVA, J. M.. Modelo de gestão para otimização do rendimento de envoltórios naturais na fabricação de linguiça suína tipo frescal. **Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção**, v. 4, n. 5, p. 124-139, 2016.

DE ANDRADE JÚNIOR, F. P.; DE MEDEIROS LIMA, B. T.; ALVES, T. W. B.; MENEZES, M. E. S. Fatores que propiciam o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em alimentos e riscos atrelados a contaminação: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 18, n. 1, p. 89-93, 2019.

DE MORAIS, E. J. F.; DE CARVALHO, C. V. F.; DE CARVALHO, C. W. B.; BARBOSA, F. R.; PEREIRA, D. E. Controle Microbiológico com Relação às Doenças Transmitidas Por Alimentos: um Estudo de Revisão Literária. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. 272, 2018.

DOMÍNGUEZ, R.; PATEIRO, M.; GAGAOUA, M.; BARBA, F. J.; ZHANG, W.; LORENZO, J. M. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat produtos. **Antioxidants**, v. 8, n. 10, pág. 429, 2019.

DUCIC, M.; KLISARA, N.; MARKOV, S.; BLAGOJEVIC, B.; VIDAKOVIC, A.; BUNCIC, S. The fate and pasteurization-based inactivation of *Escherichia coli* O157, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* in dry, fermented sausages. **Food Control**, v. 59, p. 400-406, 2016.

ED-DRA, A.; FILALI, F.R.; KARRAOUAN, B.; EL ALLAUI, A.; ABOULK, ACEM, A.; BOUCHARIF, B. Prevalence, molecular and antimicrobial resistance os *Salmonella* isolated from sausages in Meknes, Marrocos. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 340-345, 2017.

FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M.; TORRES, E. A.; SILVA, J. F. M.. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

FLORES, M.; TOLDRÁ, F. Chemistry, safety, and regulatory considerations in the use of nitrite and nitrate from natural origin in meat products. **Meat Science**, p. 108272, 2020.

GEORGES, S. O.; BERNARDO, L. G., ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CAMPO, M. R. H.; BORGES, L. J. Ecofisiologia microbiana e micro-organismos contaminantes de linguiça suína e de frango do tipo frescal. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 36, n. 1, 2019.

GIROT, J. M; MASSON, M. L; HARACEMIV, S. M. C. O uso de nitrato e nitrito em produtos cárneos e a formação de N-nitrosaminas. **Higiene alimentar**. p. 114-121, 2011.

GODFRAY, H. C. J.; AVEYARD, P.; GARNETT, T.; HALL, J. W.; TIMOTHY J. K; LORIMER, J.; PIERREHUMBERT, R. T.; SCARBOROUGH, P.; SPRINGMANN, M.; JEBB, S. A. Meat consumption, health, and the environment. **Science**, v. 361, n. 6399, 2018.

HA, J.; GWAK, E.; OH, M.; PARK, B.; LEE, J.; KIM, S.; LEE, H.; LEE, S.; YOON, Y.; CHOI, K-H. Kinetic behavior of *Salmonella* on low NaNO<sub>2</sub> sausages during aerobic and vaccum storage. . **Jornal coreano para ciência alimentar de recursos animais**, v. 36, n. 2, pág. 262, 2016.

HENTGES, D.; ZART, N.; MARMITT, L. G.; OLIVEIRA, E. C.; ADAMI, F. S. Concentrações de nitrito e nitrato em salsichas. **Revista Brasileira em promoção da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 27-33, 2016.

HONIKEL, K. O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. **Meat Science**, v. 78, p. 68-76, 2008.

JIN, S. K.; CHOI, J. S.; YANG, H. S.; PARK, T. S.; DONG-GYUN, H. Natural curing agents as nitrite alternatives and their effects on the physicochemical, microbiological properties and sensory evaluation of sausages during storage. **Meat Science**, v. 146, p. 34-40, 2018.

JUNG, S.; KIM, H. J.; PARK, S.; IN YONG, H.; CHOE, J. H.; JEON, H. J.; CHOE, W.; JO, C.. The use of atmospheric pressure plasma-treated water as a source of nitrite for emulsion-type sausage. **Meat Science**, v. 108, p. 132-137, 2015.

KIM, T. W.; KIM, C. W.; KNOW, S. G.; HWANG, J. H.; PARK D. H.; KANG, D. G.; HA J.; YANG, M. R; KIM, S. W; KIM, I. S. pH as analytical indicator for managing pork meat quality. **Sains malaysiana** , v. 45, n. 7, p. 1097-1103, 2016.

LI, X.; ZHANG, Y.; LI, Z.; LI, M.; LIU, Y.; ZHANG, D. The effect of temperature in the range of -0,8 to 4°C on lamb meat color stability. **Ciência da carne** , v. 134, p. 28-33, 2017.

LISTRAT, A.; LEBRET, B.; LOUVEAU, I.; ASTRUC, T.; BONNET, M.; LEFAUCHEUR L.; PICARD, B.; BUGEON, J. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. **The Scientific World Journal** , v. 2016, 2016.

MAPA - Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. **D. O.U.** Brasília, 05 de abril de 2000. p.6.

MCLEOD, A.; MAGE, I.; HEIR, E.; AXELSSON, L. HOLCK, A. L . Effect of relevant environmental stresses on survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in dry-fermented sausage. **Jornal Internacional de Microbiologia Alimentar** , v. 229, p. 15 a 23 de 2016.

MEIRA, N. V.; HOLLEY, R.A.; BORDIN, K.; DE MACEDO, R. E.; LUCIANO, F. B. Combination os essential oil compounds and phenolic acids against *Escherichia coli* O157: H7 *in vitro* and in dry-fermented sausage production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 260, p. 59-64, 2017.

MONTEIRO, G. M.; SOUZA, X. R.; COSTA, D. P. B.; FARIA, P. B.; VICENTE, J. Partial substitution of pork fat with canola oil in Toscana sausage. **Innovative Food Science & Emerging Technologies** , v. 44, p. 2-8 de 2017.

ORDONEZ, J.A. **Tecnologia de Alimentos de Origem Animal**. v. 2. São Paulo: Artmed, p. 279, 2005.

PATARATA, L.; NOVAIS, M.; FRAQUEZA, M. J.; SILVA, J. A. Influence of meat spoilage microbiota initial load on the growth and survival of three pathogens on a naturally fermented sausage. **Alimentos**, v. 9, n. 5, pág. 676, 2020.

PEGG, R.; SHAHIDI, F. Nitrite curing of meat. The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. 2004. **Blackwell Publishing**.

RESENDE FILHO, M. A.; DE SOUZA, K. J.; LIMA, L. C. F. Crises de segurança do alimento e a demanda por carnes no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 54, n. 3, p. 459-482, 2016.

ROSA, J. L.; BARROS, R. F.; SANTOS, M. O. Características da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, n. 1, p. 66-78, 2016.

SAS Institute Inc. 2020. SAS/STAT® 15.1 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.

SILVA, J. F. M.; FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

SOARES, K. M. P.; DA SILVA, J. B. A.; DE GÓIS, V.A. Parâmetros de qualidade de carnes e produtos cárneos: UMA REVISÃO. **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 268/269, 2017.

SONG, P.; WU, L.; GUAN, W. Dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines intake and the risk of gastric cancer: a meta-analysis. **Nutrients**, v. 7, n. 12, p. 9872-9895, 2015.

TAPIA, M. S.; ALZAMORA, S. M.; CHIRIFE, J. Effects of water activity on microbial stability as a hurdle in food preservation. **Atividade da água em alimentos: fundamentos e aplicações**, p. 323-355, 2020.

WANG, Q.; WANG, J.; DING, W.; ZHANG, D.; REED, K.; ZHANG, B. Alternatives to carcinogenic preservatives in Chinese Sausage - Sorbic acid-loaded chitosan/tripolyphosphate nanoparticles **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 28-33, 2018.

XIONG, L. Y. The storage and preservation of meat: I - Thermal Technologies. In: **Lawrie's Meat Science**. Publicação Woodhead, 2017. p. 205-230.

**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO**  
**- REVISTA THÊMA ET SCIENTIA -**

**DIRETRIZES PARA AUTORES**

**Orientações Gerais**

O artigo deve ser redigido em português;

Deverá possuir Título, Resumo e Palavras-chave em Português e em Língua Estrangeira;

Com no máximo de cinco autores, já contando o orientador;

**1 NORMAS GRÁFICAS PARA ARTIGO**

Deve ser escrito no formato Word, digitado em papel A4 (tamanho 21 cm x 29,70 cm), com margens superior de 3 cm, esquerda, direita e inferior de 2 cm, paginados, parágrafo justificado com recuo de 1 cm na primeira linha, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaçamento 1,5 em todo o corpo do artigo (o *template* já apresenta todas essas configurações);

O resumo, autoria, credenciais dos autores, citações diretas superiores a 3 (três) linhas, ilustrações e tabelas que devem obedecer as normas gráficas para citação da ABNT e serem formatados com espaço entre linhas simples e fonte 10 (o *template* já apresenta todas essas configurações).

**2 ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS**

**Título e subtítulo do trabalho:** deve constar no topo da página, em letras maiúsculas, centralizado, fonte Times New Roman, tamanho 12 e em negrito. Após o título, deixar uma linha em branco seguido do restante do trabalho;

**Nome dos autores:** autor principal seguido de co-autores. Autor e co-autores devem obedecer a sequência, Sobrenome (todas maiúsculas) seguido dos pré-nomes (Minúsculo). Exemplo: SILVA, João de Abreu;

**Credenciais dos autores:** Qualificação do(s) autor(es) e e-mail para contato que deve ser incluído no rodapé da página;

**Resumo:** deve-se deixar uma linha em branco para iniciar seu conteúdo em único parágrafo. Elemento obrigatório, constituído de uma sequência de frases concisas e objetivas e não de uma simples enumeração de tópicos, contendo, no mínimo 100 e, no máximo, 250 palavras;

**Palavras-chave:** Após o resumo, escrever o termo Palavras-chave em fonte 8, Times New Roman. Em seguida listar no mínimo 3 (três) e no máximo 5 (cinco) palavras-chave, separadas por ponto. Essas devem identificar a área do artigo e sintetizar sua temática;

Deve-se pular uma linha e fazer o mesmo para Título, Resumo e Palavras-Chave em Língua Estrangeira, todos com fonte Times New Roman 10.

### **3 TEXTO PRINCIPAL**

O trabalho deve conter:

1 INTRODUÇÃO

2 METODOLOGIA

3 REFERENCIAL TEÓRICO OU REVISÃO DE LITERATURA

4 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

REFERÊNCIAS

### **4 ORIENTAÇÕES PARA ELABORAÇÃO DA INTRODUÇÃO**

A introdução do artigo deve conter elementos essenciais a uma plena compreensão do texto. Sugere-se que os autores iniciem o texto com uma breve CONTEXTUALIZAÇÃO do assunto e após apresentem o PROBLEMA que será investigado, os OBJETIVOS, bem como, a JUSTIFICATIVA. Ao final da introdução recomenda-se que seja realizada uma apresentação sucinta da estrutura geral do artigo de modo a permitir que o leitor compreenda como o assunto será abordado a partir de então.

Sendo o artigo um ensaio teórico, na introdução o autor deverá informar que se trata de um ensaio teórico/pesquisa bibliográfica.

### **5 ORIENTAÇÕES PARA ELABORAÇÃO DO REFERENCIAL TEÓRICO OU REVISÃO DE LITERATURA**

O referencial teórico ou revisão de literatura deveria contemplar: (a) eixos teóricos essenciais para elucidar o problema de pesquisa; (b) base conceitual a compreensão dos processos subjacentes à situação problema; (c) evolução do tema; (d) conceituação; e (e) revisão dos estudos empíricos relacionados ao tema investigado.

## 6 ORIENTAÇÕES SOBRE AS CITAÇÕES (gerais)

Transcrição literal do texto (citações diretas) de outro(s) autor(es) com até TRÊS (3) linhas deverão ser escritas normalmente dentro do texto, entre aspas, e com indicação da fonte em sistema Autor/Data.

Exemplo:

“O *New Deal* (Novo Ideal[1]) foi um programa econômico adotado por Franklin Delano Roosevelt, então presidente dos Estados Unidos, que visava basicamente combater os efeitos da Grande Depressão.” (MADUREIRA, 2011, p. 75)

Madureira (2011, p. 75) afirma que: “O *New Deal* (Novo Ideal) foi um programa econômico adotado por Franklin Delano Roosevelt, então presidente dos Estados Unidos, que visava basicamente combater os efeitos da Grande Depressão.”

Citações diretas longas, com mais de Três (3) linhas deverão ser digitadas em Fonte 8, espaçamento simples, sem aspas, separado do texto por um espaço simples e recuo de 4 cm.

Exemplo:

O contexto em que Keynes apresentou sua Teoria Geral é um período marcado pela descrença no *Laissez-faire*. Período este, logo após a crise de 29, que deixou arrasada a Economia Americana, e arrastou com ela, boa parte das economias de outros países. O modelo Neoclássico, que por muitos anos teve a sua teoria baseada na intervenção mínima do Estado na economia como dominante, entrou em decadência, por não conseguir explicar os novos acontecimentos da economia mundial, com base na lei de *Say*. (MADUREIRA, 2011, p. 73)

As citações indiretas (parafraseadas) aparecem em forma normal textual e sem aspas. A fonte de onde foi retirada a informação deverá ser indicada sem o número de página.

## 7 ILUSTRAÇÕES

De acordo com a ABNT NBR 14724:2011, qualquer que seja o tipo de ilustração, sua identificação aparece na parte superior, precedida da palavra designativa (desenho, esquema, fluxograma, fotografia, gráfico, mapa, organograma, planta, quadro, retrato, figura, imagem, entre outros), seguida de seu número de ordem de ocorrência no texto, em algarismos arábicos, travessão e do respectivo título. Após a ilustração, na parte inferior, indicar a fonte consultada (elemento obrigatório), mesmo que seja produção do próprio autor, legenda, notas e outras informações necessárias à sua compreensão (se houver). A ilustração deve ser citada no texto e inserida o mais próximo do trecho a que se refere.

## **8 FORMATAÇÃO DE TÍTULOS E SUBTÍTULOS DAS SEÇÕES**

Devem ter numeração progressiva, conforme ABNT NBR6024:2012, e alinhamento à margem esquerda, sem utilizar ponto, hífen, travessão ou qualquer outro sinal após o indicativo da seção ou de seu título.

Exemplo de formatação das seções/títulos:

### **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **2.1 SUBITEM DO REFERENCIAL TEÓRICO (SE HOVER)**

##### **2.1.1 Tópico do subitem (se houver)**

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 SUBITEM DA METODOLOGIA (SE HOVER)**

##### **3.1.1 Tópico do subitem (se houver)**

## **9 REFERÊNCIAS**

Devem observar as regras da ABNT NBR 6023/2002. São apresentadas em ordem alfabética, espaço entrelinhas simples, alinhamento esquerdo e letra tamanho 10, separadas por uma linha em branco entre cada obra. Atenção: Listar somente as obras efetivamente citadas no artigo.

### **Regras Gerais: Exemplos**

#### **Artigos de Revista:**

MADUREIRA, E. M. P. Da Depressão ao Welfare State: mudanças no conceito de desenvolvimento econômico. **Revista Thêma et Scientia**, vol 1, n. 1, p. 72-80. Jan/Jun, 2011.

#### **Obra (livro):**

HIRSCHMAN, A. O. **Estratégias do Desenvolvimento Econômico**. Rio de Janeiro: Fundo de Cultura, 1961.

### **Capítulos de Livros:**

NORTH, D. C. Teoria da Localização e Crescimento Econômico. In SCHWARTZMAN, J. **Economia Regional: textos escolhidos**. Belo Horizonte: CEDEPLAR/CETREDE-MINTER, p. 291-313, 1977a. 480 p.

### **Legislação e Jurisprudência:**

BRASIL. **Constituição Federal**. Brasília: Senado Federal, 1988. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Constituicao/Constituicao.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Constituicao/Constituicao.htm)>. Acesso em: 9 jun. 2007.

BRASIL. Lei nº 6.938 de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. In: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 set. 1981. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L6938.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6938.htm)>. Acesso em: 09 jun. 2007.

### **Atenção:**

Quando a fonte for de internet é preciso indicar o endereço completo e a data de acesso (observar a pontuação correta, destacada no exemplo abaixo:

Disponível em: <<http://www.nomedosite.com.br/completo/23837u803439.htm>> Acesso em: 15 set.2010.

O mês é abreviado (somente as 03 primeiras letras)

BRASIL. Lei nº 8.078 de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. In: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 set. 1990. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L8078.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L8078.htm)> Acesso em: 9 jun. 2007.

BRASIL. Superior Tribunal de Justiça. **Acórdão de decisão que negou provimento ao pedido de dano moral ambiental**. Recurso Especial nº 598.281. Ministério Público do Estado de Minas Gerais e Município de Uberlândia. Relator: Ministro Luiz Fux. 02 de maio de 2006. Disponível em:

<<http://www.mp.rs.gov.br/areas/ambiente/arquivos/jurcivdmc.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2007.

BRASIL. Superior Tribunal de Justiça. **Súmula nº 37**. Disponível em:

<[http://www.stj.gov.br/SCON/sumulas/toc.jsp?tipo\\_visualizacao=RESUMO&livre=%40docn&&b=SUMU&p=true&t=&l=10&i=310](http://www.stj.gov.br/SCON/sumulas/toc.jsp?tipo_visualizacao=RESUMO&livre=%40docn&&b=SUMU&p=true&t=&l=10&i=310)>. Acesso em: 09 jun. 2007.

BRASIL. Tribunal de Justiça de São Paulo. **Acórdão de decisão que negou provimento pedido de indeferir perícia ambiental, em razão de aspectos processuais**. Agravo de instrumento nº 409.473-5/8-00. Ministério Público de São Paulo e José Joaquim Trindade. Relator: Desembargador Renato Nalini. 19 de outubro de 2006. Disponível em: <[http://juris.tj.sp.gov.br/pg-pesquisa/01PRODESP.asp?radio\\_pesquisa=0&num\\_processo=&dig\\_processo=&hie\\_processo=&num\\_registro=01133251&ResultStart=1&ResultCount=10&Processo=4094735800&Query=Processo+%3Cmatches%3E+4094735800&modo=simples&tipos=normal&TipoPesquisa=SQL](http://juris.tj.sp.gov.br/pg-pesquisa/01PRODESP.asp?radio_pesquisa=0&num_processo=&dig_processo=&hie_processo=&num_registro=01133251&ResultStart=1&ResultCount=10&Processo=4094735800&Query=Processo+%3Cmatches%3E+4094735800&modo=simples&tipos=normal&TipoPesquisa=SQL)>. Acesso em: 10 mai. 2007.

#### Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
2. O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word.
3. URLs para as referências foram informadas quando possível.
4. O texto está em espaço 1,5; usa uma fonte Times New Roman 12; as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na página Sobre a Revista.
6. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em [Assegurando a avaliação pelos pares cega](#) foram seguidas.