



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE AZO  
COMPOSTOS FRENTE A PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM  
ALIMENTOS**

**LUCIANA JATOBÁ E SILVA PEIXOTO**

**RECIFE - PE**

**2019**

**LUCIANA JATOBÁ E SILVA PEIXOTO**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE AZO COMPOSTOS  
FRENTE A PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia Agropecuária.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

RECIFE - PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Centra, Recife-PE, Brasil

P379a Peixoto, Luciana Jatobá e Silva  
Atividade antimicrobiana e antibiofilme de azo compostos frente  
a patógenos de importância em alimentos / Luciana Jatobá e Silva  
Peixoto. – 2019.  
84 f. : il.

Orientador: Mateus Matiuzzi da Costa.  
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2019. Ponto focal em  
Pernambuco – Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
Inclui referências.

1. Biofilme 2. Alimentos – Aditivos 3. Cordeiros 4. Carnes  
I. Costa, Mateus Matiuzzi da, orient. II. Título

CDD 620.8

# TERMO DE APROVAÇÃO

## UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO

TESE DE DOUTORADO ELABORADA POR:

LUCIANA JATOBÁ E SILVA PEIXOTO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE AZO COMPOSTOS  
FRENTE A PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 31 de maio de 2019

**Orientador:**

---

Prof. Dr. *Mateus Matiuzzi da Costa*

**Examinadores:**

---

Dra. *Renata de Faria Silva Souza* - UNIVASF

---

Profa. Dra. *Elizabeth Sampaio de Medeiros* - UFRPE

---

Prof. Dr. *Rafael Torres de Souza Rodrigues* - UNIVASF

---

Profa. Dra. *Xirely Pereira Nunes* - UNIVASF

**“Dedico ao meu pai, pela dedicação, amor e ensinamentos”**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que Ele tem me concedido, pelas pessoas que colocou no meu caminho, pelas conquistas pessoais e profissionais;

Aos meus pais, pelo amor, pelas lições de vida e por me mostrar que toda conquista sempre será fruto de uma luta diária e honesta;

Aos meus irmãos, Lívia, Marcos e Chico, pelo incentivo, vibração e felicidade compartilhadas;

Ao meu esposo, que sempre esteve ao meu lado me incentivando, apoiando, tirando dúvidas e ajudando desde a escrita do projeto até o desenvolvimento da tese;

Aos colegas do RENORBIO, pelos sorrisos e trocas de aprendizado;

Aos professores da UNIVASF que fazem parte do pólo UFRPE, por se esforçarem e suarem para trazer o programa ao Sertão, pelo desenvolvimento de pesquisas voltadas pela melhoria da região do Semiárido Nordeste;

A professora Cleônia e Cíntia, por disponibilizar material para o desenvolvimento do projeto;

Aos colegas que ajudaram no desenvolvimento do experimento; Letícia, Jéssica, Danilo, Samily, Ananda, Juliana e Ceixa, em especial a Maura, que sem medir esforços esteve presente em todas as etapas experimentais;

Aos técnicos dos laboratórios de Alimentos do IFSertão/PE, Rafael, Fernanda, Tatiana, Rodrigo e Néria pela ajuda nas pesquisas laboratoriais;

Aos colegas discentes do IFSertão/PE, Dr. Vítor Lorenzo e MSc. Márcio Rennan, no desenvolvimento do experimento do Docking Molecular;

A Dra. Eliatânia no desenvolvimento do experimento de toxicidade com *Artemia salina*;

Aos colegas do IFSertão/PE, pelo apoio e incentivo;

Ao IFSertão/PE, por conceder afastamento das atividades docentes e por ceder as instalações para o desenvolvimento desse projeto;

A Sandra e professora Aurea, pela sensibilidade e dedicação com que sempre trataram os alunos;

Aos membros da banca de qualificação e defesa de tese, Dra. Elisabeth Sampaio, Dr. Mário Miranda, Dr. Arão Viana, Dr. Rafael Torres, Dra. Xirley Nunes e Dra. Renata Souza, pelas sugestões para aperfeiçoamento do trabalho;

Ao meu orientador, professor Mateus MatiuZZi, por tudo que sempre significou e significará em minha vida, exemplo de profissional humano e apaixonado pelo que faz, sua generosidade

é sem igual, nunca terei palavras para agradecer tudo que faz por nós, espero um dia poder retribuir seu carinho e confiança depositada. Tenho muita admiração pelo senhor;

E aos meus filhos, meus tesouros, minha vida, gerados e criados no período do doutorado, a quem deixei de dar atenção nos momentos que precisei me ausentar para desenvolver as atividades e escrita da tese, mas sempre com o coração em vocês, correndo para terminar logo e ganhar um sorriso, um abraço apertado e um olhar apaixonado, obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa melhor.

“A experiência não é o que acontece com um homem. É o que um homem faz com o que lhe acontece.”

Thomas Huxley

## RESUMO

A produção animal constitui uma atividade de grande relevância para o semiárido nordestino. A carne e seus derivados são produtos de grande importância comercial crescente dado o turismo gastronômico em ascensão. Porém, como um produto de fácil contaminação pode ser veiculador de microrganismos, e os conservantes utilizados em produtos cárneos, os sais de nitrito, vem sendo descrito com alto potencial carcinogênico, dessa forma, várias são as estratégias que vêm sendo estudadas como alternativa ao uso destes sais. Assim, objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de 4 azo compostos (A1, A2, A3 e A4) em microrganismos isolados de carne de caprinos e ovinos. Não encontrou-se relatos de utilização dos azo compostos sintetizados nesse estudo em outras pesquisas onde seu uso tenha sido sugerido para alimentos. Nesse estudo também buscou-se identificar se o composto apresentava ação sinérgica *in vitro* com o nitrito de sódio, seu efeito tóxico em *Artemia salina* e investigar o mecanismo usado para inibição microbiana. Após determinou-se a vida de prateleira de linguiça de cordeiro, em tratamentos que se diferenciavam pelo agente conservante utilizado (azo composto e nitrito de sódio), tendo como grupo controle o tratamento sem adição de conservante. A partir de 21 amostras de carne, isolou-se 15 *S. aureus* (75%) e 13 *E. coli* (62%). A4 foi o azo composto que apresentou melhor atividade, com concentrações bactericida média de 230 µg/mL frente a *S. aureus*. As cepas isoladas apresentaram produção de biofilme, sendo que oito (61,5%) dos *S. aureus* com forte produção e sete (38,5%) com fraca produção e oito (61,5%) *E. coli* com fraca produção, as demais cepas de *E. coli* não foram produtoras de biofilme. O composto A4 foi capaz de interferir na formação do biofilme em todos os isolados de *S. aureus* forte produtores e interferiu no biofilme consolidado em 50% desses isolados. O nitrito de sódio apresentou CBM média de 67 µg/mL, e no teste de sinergismo com A4, nove (60%) *S. aureus* apresentaram redução da CBM em ação sinérgica. No teste de vida de prateleira as variáveis umidade e pH não demonstraram diferenças nos tratamentos, porém, a colorimetria do tratamento com A4 apresentou resultados superiores aos demais. Já na contagem microbiana, o composto teste exibiu redução para contagem de *S. aureus*, microrganismos mesófilos e psicrotróficos quando comparado ao grupo controle (sem adição de conservantes), mas sem diferença na enumeração de coliformes, entretanto as contagens de bactérias dos testes com o nitrito de sódio foram inferiores ao tratamento com A4. Buscando avaliar o possível mecanismo de ação do composto em microrganismos patogênicos, identificou-se através de docking molecular que A4 apresentou afinidade com a proteína FtsA, indicando que a inibição de *S. aureus* pode estar relacionada a interferência na interação com a FtsZ inibindo a divisão celular e causando a morte bacteriana. A4 apresentou taxas de mortalidade de 96% para a toxicidade em *Artemia salina* na concentração de 10 µg/mL e 100% em concentrações superiores. O estudo demonstrou que o azo composto apresentou efeito antimicrobiano *in vitro*, porém, sua ação tóxica deve ser avaliada com organismos superiores, para obter-se resultados mais próximos aos seres humanos, bem como testes de sinergismo com o sal de nitrito em teste de prateleira para avaliar a eficácia dos mesmos em concentrações reduzidas.

**Palavras-chave:** biofilme, conservantes, cordeiro, mercado público, produtos cárneos, sinergismo.

## ABSTRACT

Animal production constitutes an activity of great importance for the Northeastern semiarid. Meat and its derivatives are products of great commercial importance, either for the regional consumer or as a tourism product in a rising gastronomic pole. However, as an easily contaminating product it might be a carrier of microorganisms, and the preservatives employed in meat products, the nitrite salts, have been described as of high carcinogenic potential. Consequently, several strategies have been explored as alternatives to the use of these salts. Therefore, this work aimed to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of 4 azo compounds (A1, A2, A3, and A4) on microorganisms isolated from lamb and sheep meat. No reports regarding the use of the azo compounds synthesized in this research were found in other studies where their use is suggested for foods. In this study, it was also investigated if the compound presented *in vitro* synergistic action with the sodium nitrite, its toxic effect on *Artemia salina* and the mechanism used for microbial inhibition. Afterward, the shelf life of the lamb sausage was determined through treatments that differed in the preservative agent employed (azo compounds and sodium nitrite), with a treatment without preservative addition as a control group. Out of 21 meat samples, it was possible to isolate 15 *S. aureus* (75%) and 13 *E. coli* (62%). The A4 was the azo compound that presented the best activity, with a mean bactericidal concentration of 230 µg/mL on *S. aureus*. The isolated strains presented biofilm production, with eight (61.5%) of the *S. aureus* presenting a strong and seven (38.5%) with a weak production, and eight (61.5%) of the *E. coli* presenting a weak production. The remaining *E. coli* strains were not biofilm-producing. The A4 compound was able to interfere in the formation of biofilm in all the strong producers isolates of *S. aureus* and interfered in the established biofilm in 50% of these isolates. The sodium nitrite presented mean MBC of 67 µg/mL, and in the synergism test with the A4, nine (60%) *S. aureus* presented reduction of the MBC in synergistic action. In the shelf life test, the variables moisture and pH did not demonstrate differences in the treatments, although the colorimetry of the treatment with the A4 presented superior results to the remainder. As for the microbial counting, the test compound exhibited a reduction for the counting of *S. aureus*, mesophilic, and psychrotrophic microorganisms when compared to the control group (without preservative addition), although without difference in the enumeration of coliforms; however, the counting of bacteria in the tests with sodium nitrite were inferior to the treatment with the A4. Aiming to evaluate the possible action mechanism of the compound in pathogenic microorganisms, it was identified through molecular docking that the A4 presented affinity with the FtsA protein, suggesting that the inhibition of *S. aureus* might be related to the interference in the interaction with the FtsZ, inhibiting cell division and causing bacterial mortality. The A4 presented mortality rates of 96% for the toxicity in *Artemia salina* in the concentration of 10 µg/mL and 100% for upper concentrations. The study demonstrated that the azo compound presented an *in vitro* microbial effect, although its toxic action should be evaluated with superior organisms in order to obtain results closer to human beings, as well as synergism tests with the nitrite salt in shelf-life in order to evaluate their efficacy in reduced concentrations.

**Keywords:** biofilm, lamb, meat products, preservatives, public market, synergism.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo 01</b>		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b>	Esquema de reação do acoplamento dos azo compostos (A1, A2, A3, A4).	51
<b>Figura 2.</b>	Estrutura química dos azo compostos (A1, A2, A3, A4).....	57
<b>Capítulo 02</b>		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b>	Variação de umidade nos tratamentos sem (1a) e com (1b) contaminação experimental e pH sem (fig. 1c) e com contaminação (fig. 1d).....	75
<b>Figura 2.</b>	Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbicos em linguiça de cordeiro sem (2a) e após contaminação experimental.....	76
<b>Figura 3.</b>	Contagem total de microrganismos psicrotrófilos em linguiça de cordeiro sem (3a) e após (3b) contaminação experimental.....	77
<b>Figura 4.</b>	Contagem de <i>S. aureus</i> em linguiça de cordeiro sem (4a) e com (4b) contaminação experimental.....	78

## LISTA DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela 1.</b> Estudos mundiais com substâncias com ação na inibição do biofilme de bactérias de importância na indústria de alimentos nos últimos 5 anos.....	26
<b>Tabela 2.</b> Estudos sobre ação antibacteriana de produtos naturais em carne e seus derivados entre os anos de 2014 a 2018.....	29
<b>Tabela 3.</b> Tabela 3 – Azo compostos com uso permitido no Brasil com suas numerações de referência e limites de uso tolerável segundo o <i>Codex Alimentarius</i> .....	31
<b>Tabela 4.</b> Estudos sobre ação antimicrobiana e antibiofilme de azo compostos nos últimos 10 anos.....	32

### Capítulo 01

	Pág.
<b>Tabela 1.</b> Micro-organismos isolados de carne de pequenos ruminantes comercializada em mercado público na região do Semiárido do Nordeste do Brasil no período de março a junho/2017.....	56
<b>Tabela 2.</b> Concentração inibitória mínima dos isolados frente aos azo compostos....	58
<b>Tabela 3.</b> Concentração bactericida mínima dos isolados frente aos azo compostos...	58
<b>Tabela 4.</b> Interferência do HMAB na formação de biofilme dos isolados de <i>S. aureus</i> .....	60
<b>Tabela 5.</b> Interferência do HMAB no biofilme consolidado dos isolados de <i>S. aureus</i> .....	60
<b>Tabela 6.</b> Efeito combinatório entre o HMAB e Nitrito de sódio 7%, frente a isolados de <i>S. aureus</i> ....	62
<b>Tabela 7.</b> Energias de ancoramento de MolDock para HMAB e ligantes originais em enzimas envolvidas no mecanismo antimicrobiano (DNA Gyrase – DNAG, MurD Ligase – MurD, Protein FtsA – PFtsA).....	63
<b>Tabela 8.</b> Percentual de morte no teste de toxicidade para <i>Artemia salina</i> com HMAB e nitrito de sódio.....	64

<b>Tabela 1.</b>	Tratamentos realizados nas linguiças de carne de cordeiro.....	73
<b>Tabela 2.</b>	Resultados das leituras de colorimetria em linguiças de carne de cordeiro .....	76
<b>Tabela 3.</b>	Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbicos em linguiça de cordeiro sem e após contaminação experimental (Log <sub>10</sub> UFC/g).....	77
<b>Tabela 4.</b>	Contagem total de microrganismos psicrotróficos em linguiça de cordeiro sem e após contaminação experimental (Log <sub>10</sub> UFC/g).....	77
<b>Tabela 5.</b>	Enumeração de coliformes totais e termotolerantes em linguiça de cordeiro sem e com contaminação experimental por <i>S. aureus</i> tratada com HMAB e nitrito de sódio.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CH	Colite hemorrágica
DO	Densidade Óptica
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
HMAB	4-Hidroxi-2-metilazobenzeno
NO	Composto N-nitroso
NOCs	Compostos N-nitrosos carcinogênicos
NMP	Número mais provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
SE's	Enterotóxina estafilocócica
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
Stx	Shiga toxina
SUH	Síndrome urêmica hemolítica
UFC	Unidade formadora de colônia
USI	Ultra-som de alta intensidade
UV	Ultravioleta
VE	Vigilância Epidemiológica

## LISTA DE SÍMBOLOS

N.º	Número
Kg	Quilograma
%	Porcentagem
US \$	Dolar
a.C.	Antes de Cristo
h	Hora
pH	Potencial hidrogeniônico
mM	milimolar
molL <sup>-1</sup>	Mol por litro
<	Menor quê
>	Maior quê
g	Gramma
mg	Miligramma
µg	Microgramma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 IMPORTÂNCIA E CARACTERÍSTICAS DOS PRODUTOS</b> <b>CÁRNEOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME E SEUS ENTRAVES NA INDÚSTRIA DE</b> <b>ALIMENTOS.....</b>	<b>23</b>
<b>2.4 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO EMPREGADOS NA INDÚSTRIA DE</b> <b>PRODUTOS CÁRNEOS.....</b>	<b>25</b>
<b>2.5 AZO COMPOSTOS E SUA UTILIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE</b> <b>ALIMENTOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>CAPÍTULO 1. Atividade Antimicrobiana de Azo Compostos frente a</b> <b>Bactérias Isoladas de Carne Caprina e Ovina.....</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO 2. Efeito antimicrobiano de azo composto em linguiça de</b> <b>cordeiro contaminada com <i>Staphylococcus aureus</i>: shelf-life e atributos de</b> <b>qualidade.....</b>	<b>70</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Considerando o crescimento populacional e o ritmo da sociedade atual, existe uma grande necessidade e busca por produtos industrializados, com a principal característica de fácil preparo. No entanto, há também uma crescente preocupação por parte da comunidade científica com relação aos possíveis problemas de saúde que podem aparecer em situações de ingestão por um longo prazo.

Dentre os produtos amplamente consumidos nos diversos países, tem-se os produtos cárneos, em função dos aspectos sensoriais e principalmente à variedade de produtos que não demandam muito tempo para o preparo, disponíveis nas gôndolas de supermercados. Diante dessa variedade, o consumidor é atraído, contribuindo para que produtos tais como salsichas, salames, mortadelas, linguiças, empanados, almôndegas e hambúrgueres sejam opção crescente como componentes de refeições rápidas para o lanche de muitas famílias no mundo todo (OLIVEIRA et al., 2013).

Estes produtos cárneos têm origem em uma grande diversidade de processos tecnológicos, sendo comumente classificados em emulsionados, reestruturados, injetados, fermentados, congelados, enlatados, tratados termicamente, entre outras classificações. A qualidade físico-química e sensorial destes produtos é influenciada por uma série de fatores, desde os processos empregados para obtenção até os ingredientes usados para conservação dos produtos cárneos (PAGLARINI, 2015).

Com relação as carnes processadas curadas pela ação de nitritos quando sofrem cozimento excessivo tendem a resultar a formação de produtos genotóxicos durante a digestão (HECKE et al, 2015). As nitrosaminas formadas são uma das preocupações mais atuais relacionadas ao consumo de produtos cárneos. Dessa forma, estudos com novos conservantes para uso em produtos cárneos tem se tornado uma das principais vertentes na área. Vários extratos e óleos essenciais de plantas foram relatados com ação antimicrobiana, porém o forte odor e sabor limitam seu uso como conservante de alimentos (SCHIRMER e LANGSRUD, 2010).

Considerando a necessidade da conservação dos produtos cárneos com substâncias inócuas, este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade de bactérias isoladas de carne caprina e ovina frente a quatro azo compostos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 IMPORTÂNCIA E CARACTERÍSTICAS DOS PRODUTOS CÁRNEOS**

A carne ocupa um lugar de destaque, assumindo a condição de alimento soberano em diferentes contextos, culturas e grupos sociais. A carne bovina estaria no topo da hierarquia alimentar, seguida das carnes brancas (frango e peixe). Historicamente, a ampliação ao acesso à carne no Brasil apresenta uma associação com a colonização europeia (RIBEIRO e CORÇÃO, 2013).

De acordo com Proença (2010), a alimentação é uma das atividades humanas mais antigas, não apenas por razões biológicas evidentes, mas também por contemplar aspectos econômicos, sociais, científicos, políticos, psicológicos e culturais, sendo fundamentais no processo de evolução das diversas sociedades.

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), carnes são “massas musculares e os demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a massa óssea correspondente, procedentes das diferentes espécies animais, julgadas aptas para o consumo pela inspeção veterinária oficial”. Este regulamento traz o conceito de espécies de açougue como sendo os bovinos, búfalos, equídeos, suídeos, ovinos, caprinos, lagomorfos e aves domésticas, bem como os animais silvestres criados em cativeiro, abatidos em estabelecimentos sob inspeção veterinária (BRASIL, 2017).

Quanto aos aspectos gerais dos produtos cárneos, a coloração apresenta-se como característica variável entre as espécies animais, sendo também relacionada com a atividade física do animal. O componente que confere cor a carne é a mioglobina (VENTURINI et al., 2007).

No que se refere ao aspecto nutricional, a carne constitui uma fonte rica em proteínas de alto valor biológico, sendo nutricionalmente importante, uma vez que apresenta aminoácidos essenciais. As proteínas têm um papel fundamental nos seres vivos, uma vez que estão associadas a estrutura dos diversos tecidos do organismo, além de estar presente nos diversos fluidos corporais. Os ácidos graxos de cadeia longa encontrados nas carnes também demonstram a importância nutricional desse alimento, a exemplo dos ômega 3, 6 e 9. Além das proteínas e ácidos graxos, as carnes também são ricas em vitaminas hidrossolúveis do complexo B, além da vitamina A. Na carne bovina, observa-se uma maior quantidade de vitamina E, considerada antioxidante. Os minerais também estão presentes nas diversas carnes, entre eles o ferro, fundamental na formação da hemoglobina do sangue, além do zinco e cálcio,

encontrados em maior quantidade na carne bovina (PHILIPPI, 2006; MONTEBELLO e ARAÚJO, 2009).

Embora o consumo de carne tenha sido relativamente estático no mundo desenvolvido, o consumo anual de carne per capita dobrou desde 1980 nos países em desenvolvimento. A população crescente e os rendimentos, juntamente com as mudanças nas preferências alimentares, estão aumentando a demanda por produtos pecuários. A produção mundial de carne deve dobrar até 2050, a maioria dos quais é esperada nos países em desenvolvimento. O crescente mercado de carne oferece uma oportunidade significativa para pecuaristas e processadores de carne nesses países. No entanto, o aumento da produção pecuária e o processamento e comercialização de produtos cárneos seguros representam um grande desafio. Bem como, a utilização e o consumo subsequente de diferentes espécies de animais variam conforme as preferências culturais e as crenças religiosas de uma população, sendo fontes mais comuns as espécies animais domesticadas, como bovino, suínos e aves e, em menor percentual, bubalinos, ovinos e caprinos (FAO, 2019).

Quanto a produção de bovinos, o Brasil detém o segundo maior rebanho comercial do mundo, sendo um dos maiores exportadores do mundo. Aproximadamente 140 países importam a carne bovina brasileira, embora poucos os esforços para promoção do produto no exterior, com exceção dos últimos dois anos quando um movimento ainda modesto de divulgação começou junto aos principais importadores. Apesar de ser considerado um mercado pouco exigente e tão somente preocupado com preços baixos, observa-se que uma crescente preocupação do consumidor brasileiro com a higiene do produto e grau de maciez, sendo fundamental a preocupação com a manutenção do grande mercado interno, considerando que os aumentos no consumo per capita de carne suína e, principalmente, de carne de frangos, mostram que a preferência do consumidor brasileiro pela carne bovina pode sofrer alteração (LUCHIARI FILHO, 2006).

No primeiro trimestre de 2018, estima-se que foram abatidas 7,72 milhões de cabeças de bovinos sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária, sendo essa quantidade 4,2% menor que a registrada no trimestre anterior (BRASIL, 2018a). Por outro lado, dados relacionados a exportação da carne bovina, publicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), apontam para um crescimento de aproximadamente 11,1% neste mesmo período de 2018, sendo que o principal país importador foi Hong Kong, seguido da China (BRASIL, 2018b).

Com relação ao percentual de estabelecimentos de menor porte, que abateram até 100 cabeças diárias nesse período, observou-se um valor de 80,4% do total de abatedouros do País, sendo responsáveis por 17,6% dos bovinos abatidos. Por outro lado, os estabelecimentos de maior porte foram responsáveis por 82,4% do total de animais abatidos, apesar de constituírem apenas 19,7% do total de estabelecimentos (BRASIL, 2018a). Do total de abatedouros contemplados nesta pesquisa, 194 possuíam o Serviço de Inspeção Federal (SIF), 374 o Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e 543 o Serviço de Inspeção Municipal (SIM), respondendo, respectivamente, por 77,3%, 17,1% e 5,6% do peso acumulado das carcaças produzidas.

Quanto a carne caprina, esta é considerada magra, com uma composição química que contempla as exigências dos atuais consumidores. Por outro lado, a carne ovina apresenta-se mais macia e succulenta. Uma característica peculiar dessas espécies é o aroma característico. As carnes de melhor qualidade nutricional e sensorial passaram a ser preferência, sendo mais saudáveis e, em alguns casos, com propriedades funcionais (GERMANO et al., 2008).

Com relação a espécie suína, estima-se que foram abatidas 10,72 milhões de cabeças de suínos, no primeiro trimestre de 2018, representando aumento de 2,3% na comparação com o mesmo período de 2017. A Região Sul respondeu por 66,4% do abate nacional de suínos, seguida pelas Regiões Sudeste (18,1%), Centro-Oeste (14,5%), Nordeste (0,9%) e Norte (0,1%) (BRASIL, 2018a).

No que se refere ao abate de frangos, no primeiro trimestre de 2018, foram abatidas 1,48 bilhão de cabeças de frangos, um aumento de 3,5% em relação ao trimestre. A Região Sul respondeu por 60,2% do abate nacional de frangos nesse período, seguida pelas Regiões Sudeste (19,7%), Centro-Oeste (14,5%), Nordeste (3,9%) e Norte (1,7%) (BRASIL, 2018a).

No que se refere a produção de frangos de corte, considera-se que esta é forma mais eficiente e barata de produzir proteína animal para alimentação humana no mundo. Isto decorre da característica que o frango tem de alta eficiência na transformação dos grãos em proteína animal, em curto tempo, com utilização de pouco espaço, pouca água e energia, sendo possível, após o abate, utilizar o animal inteiro, tendo total aproveitamento. A maior parte dos frangos é produzida em sistemas industriais com alta eficiência econômica na utilização de recursos e mão de obra. Os Estados Unidos são o maior produtor mundial de frangos e segundo exportador, sendo o Brasil o maior exportador mundial de frangos, com US \$2,7 bilhões em vendas para 142 países. Nos dois países e no mundo inteiro a produção de frangos continuará crescendo aceleradamente nos próximos anos (OVIEDO-RONDÓN, 2008).

Quanto as espécies caprina e ovina, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) revelam que o Nordeste brasileiro é a única região onde os rebanhos de caprinos e de ovinos cresceram ao mesmo tempo, entre os anos de 2006 e 2017. Observa-se que nesta região, os rebanhos de caprinos e ovinos tiveram aumentos de 18,38 e 15,94%, respectivamente. Por outro lado, o rebanho de bovinos apresentou uma redução de 2,44% do rebanho nacional, sendo esta redução mais acentuada na região Nordeste (BRASIL, 2017).

Dentre as carnes mais consumidas no mundo, a caprina é a mais magra, uma vez que apresenta o menor teor de gordura, sendo mais magra que a carne de frango. Por exemplo, em cada 100 g de carne assada ao forno, a carne caprina apresenta 2,75 g de gordura, contra 3,75 g da de frango, 17,14 g da bovina e 25,72 g da suína. Embora seja considerada um alimento altamente saudável, estima-se que o consumo per capita de carne ovina, no Brasil, não alcance 500 g/pessoa/ano. Pode-se observar que o consumo de carne caprina e ovina ainda é baixo, quando comparado com as demais carnes, tais como a carne de bovinos (35 kg/hab/ano), aves (44 kg/hab/ano) e suínos (15 kg/hab/ano). O Brasil pode se beneficiar do aumento da demanda de carne ovina pelos países importadores. O aumento do rebanho nacional, o incremento da oferta de animais jovens para abate e o fortalecimento da cadeia produtiva por meio da organização de produtores constituem desafios a serem alcançados para que o país possa exportar carne ovina para países de maior consumo (LUCENA et al. 2018).

Observa-se cada vez mais a busca por alimentos industrializados de fácil preparo. Dessa forma, cada vez mais a academia e a indústria alimentícia têm investido esforços para inovação tecnológico no setor e, dessa forma, ofertar alimentos capazes de nutrir, promover o bem-estar e reduzir os riscos de doenças crônicas. Dentre os resultados deste processo de avanço tecnológico, tem-se uma ampla variedade de produtos cárneos que não demandam muito tempo de preparo, tornando-se atrativos para os consumidores (OLIVEIRA et al., 2013).

## **2.2 PRINCIPAIS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS**

O crescimento populacional, a urbanização e as mudanças nos hábitos de consumo, incluindo viagens, aumentaram o número de pessoas comprando e comendo alimentos preparados em locais públicos, provocando uma crescente demanda dos consumidores por uma maior variedade de alimentos, resultando em uma cadeia alimentar global cada vez mais complexa e mais longa, criando desafios para a segurança alimentar e aumento na incidência de doenças transmitidas por alimentos DTA's (OMS, 2017).

Os alimentos podem se tornar contaminados em qualquer ponto de produção e distribuição, e a responsabilidade primária recai sobre os produtores de alimentos. Porém, a grande maioria de doenças transmitidas por alimentos são causadas por alimentos mal preparados ou manuseados inadequadamente nos ambientes de comercialização e preparo. Nem todos os manipuladores de alimentos e consumidores têm conhecimento das práticas higiênicas básicas ao comprar, vender e preparar alimentos para evitar contaminações (FEGAN E JENSON, 2018; OMS, 2017).

Todos os anos, milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos e milhares de mortes associadas ocorrem nos Estados Unidos, e o ônus da doença é ainda maior nos países em desenvolvimento. Porém, nem todos os casos são relatados, logo esses dados são subestimados. (CDC, 2013).

No Brasil, a vigilância epidemiológica das DTA's (VE-DTA) monitora os casos de surtos alimentares, episódio em que duas ou mais pessoas apresentam doença semelhante, sem haver notificação compulsória dos casos isolados, mesmo assim, são notificados em média, por ano, 700 surtos de DTA, com envolvimento de 13 mil doentes e 10 óbitos (BRASIL, 2018).

Alguns alimentos estão mais associados as DTA's, como é o exemplo dos produtos crus de origem animal. A cadeia produtiva da carne abrange uma variedade de micro-organismos, dentre eles estão *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. (*C. botulinum* e *C. perfringens*) e *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*, *C. coli* e *C. fetus*) (YANG et al., 2016). Sendo as bactérias relatadas como o principal agente etiológico.

A salmonelose é uma doença infecciosa de origem alimentar em humanos e animais e pode se originar de uma ampla gama de produtos alimentícios, dada sua presença contínua em sistemas de produção de alimentos (RICKE et al., 2018; RAJAN et al., 2017; WU et al., 2017). A fonte inicial da infecção é o trato intestinal de pássaros e outros animais. Aparentemente, pequenos ruminantes saudáveis podem se tornar portadores subclínicos e persistentemente liberar a bactéria em suas fezes, logo, constituindo um reservatório para o patógeno, porém o risco de salmonelose de origem alimentar devido ao consumo de carne de pequenos ruminantes, especialmente na condição de carne bem cozida sempre foi considerado baixo (ESMAEILI e RAHMANI, 2016).

Hollfman et al. (2017) em estudo global da OMS onde correlacionaram os alimentos responsáveis pelas DTA's estimaram que a maioria das salmoneloses são causadas por consumo

de ovos, carne de frango e carne suína, apenas 2,5% dos casos estariam ligados ao consumo de carne de pequenos ruminantes. No mesmo estudo, esse alimento tem um índice bem mais alto quando relacionado a doenças causadas por *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), com percentuais de 20 a 25% nas subregiões da África e Mediterrâneo Oriental.

STEC é um grupo de patógenos emergentes que podem causar doenças, incluindo síndrome urêmica hemolítica (SUH) e colite hemorrágica (CH) (MEIRA et al., 2017). A SUH causada por *E. coli* O157: H7 pode causar potencialmente complicação fatal, e atualmente apenas a terapia de suporte está disponível, alguns antibióticos aumentam a expressão de Shiga toxina (Stx), e isso provavelmente é responsável pela associação com o aumento do risco do tratamento com antibiótico para gravidade da doença, produzindo perda muito severa e rápida da integridade da estrutura epitelial do intestino (KARVE et al., 2017). Logo, STEC é um risco direto para o consumidor, especialmente quando isolado de carne, e essa contaminação pode ocorrer durante os diferentes estágios de abate (SANTOS et al., 2018).

Outra bactéria que apresenta potencial bem descrito de importância na cadeia produtiva de alimentos é a *L. monocytogenes*, é uma bactéria oportunista que pode infectar principalmente pacientes imunodeprimidos, é encontrada em muitos alimentos, incluindo leite não pasteurizado, carne e seus produtos, frutos do mar e vegetais. É um patógeno intracelular com potencial único para se espalhar de célula para célula, atravessando, assim, barreiras hematoencefálicas, intestinais e placentárias e pode causar aborto espontâneo em mulheres grávidas ou matar pessoas infectadas se o agente patogênico se mover para o cérebro. Todas as cepas são consideradas igualmente virulentas, devido à alta morbidade e letalidade (DHAMA et al., 2015; SCALLAN et al., 2011).

*L. monocytogenes* pode ser introduzida em produtos cárneos durante o processamento e o grau de contaminação depende da extensão da contaminação cruzada, medidas higiênicas dos manipuladores de alimentos e os parâmetros de processamento (ZHU et al., 2012). Além disso, o gênero *Listeria* é capaz de crescer em temperaturas de refrigeração (ELMALI et al., 2015; RISTORE et al., 2014). Schafer et al. (2017) identificaram que existe uma grande incidência de contaminação de carne de frango nas etapas de corte, com alta contaminação de utensílios e equipamentos, havendo um crescimento linear após etapas de resfriamento, logo, é imprescindível que haja um controle nas etapas anteriores (GUILBAUD et al., 2015; ADETUNJI et al., 2014).

Os *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) são capazes de produzir mais de 20 tipos de enterotoxinas (SEs), a contaminação de alimentos por enterotoxinas de *S. aureus* pré-

formadas é uma das causas mais comuns de doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos (HENNIKINNE et al., 2012). Embora várias SEs tenham sido identificadas, a SEA, uma SE altamente estável ao calor, é a causa mais comum nas doenças estafilocócicas transmitidas por alimentos em todo o mundo. Os sintomas são de início rápido e incluem náusea e vômito violento, com ou sem diarreia. A doença geralmente é autolimitada e apenas ocasionalmente é grave o suficiente para justificar a hospitalização (WAKABAYASHI et al., 2018; KADARIYA, 2014; ARGUDÍN et al., 2010).

A prevalência de *S. aureus* em muitos produtos alimentares tem sido registrada, incluindo carne crua e seus retalhos, indicando que os consumidores estão em risco potencial de colonização por *S. aureus* e subsequente infecção. A presença do patógeno em produtos alimentícios impõe perigo potencial aos consumidores e causa graves perdas econômicas na produtividade humana através de doenças transmitidas por alimentos. Os sintomas das intoxicações alimentares estafilocócicas incluem náuseas, vômitos e cólicas abdominais com ou sem diarreia. Medidas preventivas incluem manuseio seguro de alimentos e práticas de processamento, manutenção da cadeia de frio, limpeza adequada e desinfecção de equipamentos, prevenção de contaminação cruzada em casa e na cozinha, e prevenção de contaminação da fazenda para mesa (KADARIYA, 2014).

O processamento térmico é uma das ferramentas utilizadas para reduzir eficazmente as quantidades de bactérias que podem estar potencialmente presente em carnes, aves e laticínios. As bactérias, na maioria dos casos, são inativadas durante este processo, mas toxinas pré-formadas, como as SEs, podem persistir e possuem diferentes mecanismos para sua inativação quanto a temperatura e pH, indicando que este processo não pode ser o único para elaboração de alimentos seguros (REGENTHAL et al., 2017).

É fundamental implementar estratégias baseadas na ciência que abordem a segurança alimentar e que tenham sido avaliadas quanto à eficácia no controle e/ou eliminação de perigos. (BYRD-BREDBENNER et al., 2015). Muitos países de baixa e média renda não possuem tais estratégias, e o número de mortes por causas específicas tem que ser estimado a partir de dados incompletos. Melhorias na produção de dados de alta qualidade sobre a causa da morte são cruciais para melhorar a saúde e reduzir as mortes evitáveis nesses países (OMS, 2018).

## 2.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME E SEUS ENTRAVES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Os microrganismos possuem a habilidade de se aglomerar em grandes quantidades, formando comunidades denominadas biofilme, uma matriz de polissacarídeos extracelular que os protege de tensões, como radiação UV, choque osmótico, dessecação, agentes antimicrobianos e predação, lhes conferindo capacidade de aderir em superfícies e de absorver e compartilhar nutrientes disponíveis (MARTI et al., 2017; MERINO et al., 2017; OLOKETUYI e KHAN, 2017). A adesão e formação de biofilme de patógenos alimentares atrai a atenção de pesquisadores e tem sido uma preocupação para os processadores de alimentos (ZHANG et al., 2017).

A capacidade de formar biofilme varia muito não apenas entre as espécies, mas na mesma espécie com diferentes cepas e sorovares, a intensidade de formação de biofilme pode variar significativamente, bem como um tipo de bactéria pode ser um forte produtor de um determinado ambiente e tornar-se fraco em outro ambiente (SREY et al., 2013).

Como a maioria dos microrganismos é capaz de produzir biofilmes, as espécies patogênicas podem ser uma preocupação potencial para saúde pública e segurança alimentar (STRATAKOS et al., 2018; COSSU et al., 2017; PIERCEY et al., 2016). Patógenos alimentares, como *S. aureus* e *S. epidermidis* tornaram-se as principais causas de contaminação de produtos alimentares e propagação de doenças. A formação e maturação do biofilme de *S. aureus* é afetado por fatores complexos, como subtipos, locus genético, condições ambientais e superfícies de adesão, o biofilme formado por esse microrganismo é frequentemente identificado em uma ampla gama de indústrias de alimentos (MIAO et al., 2016).

A *E. coli* enterohemorrágica O157: H7 é um patógeno freqüente e potente, com potencial poder de virulência, capacidade de formação de biofilme e resistência antimicrobiana, provocando doenças graves em humanos. Os biofilmes formados por *E. coli* O157: H7 facilitam a contaminação cruzada protegendo os patógenos das operações de limpeza e saneamento (KIM et al., 2018; NAGY et al., 2015). Yang et al. (2016) observaram que a fração rica em taninos da casca da romã foi capaz de inibir a produção de biofilme e reduzir a motilidade de isolados de *E. coli*.

A formação e desenvolvimento de biofilme de *L. monocytogenes* na indústria alimentar têm sido uma grande preocupação, contribuindo para perdas econômicas, adulteração de produtos e surtos de doenças transmitidas por alimentos. Após estabelecimento do biofilme seu controle ou eliminação se torna muito difícil, devido à sua resistência a diferentes

estratégias de inibição. Diferentes abordagens, com métodos físicos, químicos ou biológicos têm sido empregados, mas existem grandes desvantagens que incluem baixa eficácia, temperatura ineficaz na superfície de contato, custo, segurança e aspectos regulatórios (OLOKETUYI e KHAN, 2017).

A maioria dos estudos que avaliam a formação de biofilme em bactérias utiliza temperaturas de 30 a 37 °C, em vez de temperaturas encontradas nas plantas de processamentos de indústrias de alimentos. Utilizando essa temperatura, Piercey et al. (2016) identificaram 9 genes (*lmo2572*, *lmo2488* (*uvrA*), *lmo1224*, *lmo0434* (*inlB*), *lmo0263* (*inlH*), *lmo0543*, *lmo0057* (*EsaA*), *lmo2563*, *lmo0453*) de *L. monocytogenes* que não haviam sido relatados anteriormente com a produção de biofilme.

A carne e seus derivados são produtos muito propensos ao desenvolvimento microbiano, assim como o suco que a mesma perde nas etapas de abate e processamento na indústria. Esse produto aumentou a formação de biofilme de *Salmonella* e *Campylobacter* em superfícies abióticas e em condições estáticas ou de fluxo (LI et al., 2017). A contaminação de superfícies no ambiente de processamento de alimentos pode resultar na formação de biofilme com risco de contaminação de alimentos (CORCORAN et al., 2014). *Salmonella* sp. isolada de carcaças de frango congelados no estado do Paraná, apresentaram uma taxa de produção de biofilme de 72,7% (SERENO et al., 2017).

Chaturongkasumrit et al. (2001) identificaram que a rugosidade das correias transportadoras de alimentos são propícias a formação de biofilme, assim como aço inoxidável, vidro e borracha também são favoráveis para adesão (KRONING et al., 2016; CHIA et al., 2009). Superfícies rugosas ou porosas também são materiais de difícil penetração de soluções sanitizantes, facilitando a formação de biofilme.

Vários métodos de eliminação de biofilme do ambiente de plantas de processamento são utilizados para garantir a segurança microbiológica durante a produção de alimentos. Eles incluem métodos físicos, químicos e biológicos (SKOWRON et al., 2018). Em um dos estudos com material biológico, Tan et al. (2017) observaram que cepas de *Pediococcus acidilactici* (PA003) foram efetivos na redução do biofilme de *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* em aço inoxidável, cloreto de polivinil e lâminas de vidro.

*L. monocytogenes* em biofilme desenvolveu maior tolerância tanto ao ácido paracético como para a amônia quaternária (CHAGNOT et al., 2014). Corcoran et al. (2014) obtiveram resultados semelhantes ao estudo anterior, com o hidróxido de sódio eliminando o biofilme de *Salmonella* formado em 48 h, sendo que o biofilme de 168 h não foi eliminado, e o hipoclorito

de sódio e benzalcônio não apresentaram eficiência em nenhum dos biofilmes formados (48 h e 168 h). Já Silva et al. (2017) obtiveram resultados favoráveis no uso de sanitizantes comerciais a base de cloro e amônia quaternária na eliminação de biofilme de *L. monocytogenes*, sendo, então empregados na higienização dos equipamentos do estabelecimento usado no estudo.

Bactérias em biofilme podem ser até mil vezes mais resistentes aos antibióticos e conservantes do que a mesma bactéria circulando em um estado planctônico (TAN et al., 2017; CHOPRA et al., 2015). A resistência aos antibióticos é uma questão crescente, representando um grande desafio para os cuidados de saúde, logo, é essencial desenvolver métodos eficazes e práticos para controlar e inibir a formação de biofilmes bacterianos, novos agentes antibacterianos com capacidade de inibir biofilmes bacterianos são importantes para utilização na indústria de alimentos (MIAO et al., 2016; PETROVA et al., 2016).

Logo, a identificação de novos agentes com ação antibiofilme para utilização como desinfetante e conservante em alimentos tem sido amplamente estudado na área (Tabela 1).

## **2.4 MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO EMPREGADOS NA INDÚSTRIA DE PRODUTOS CÁRNEOS**

A carne é um alimento rico em nutrientes que fornece condições ideais para os desenvolvimento microbiano. Alguns microrganismos simplesmente deterioram o produto, enquanto outros, são uma ameaça à saúde pública. Em ambos os casos, a carne deve ser descartada da cadeia alimentar, conseqüentemente, podendo torna-se um problema ambiental. Em todo o mundo, mais de 20% da carne produzida é perdida ou desperdiçada. Por isso, esforços coordenados do campo à mesa são necessários para melhorar o controle microbiano como parte de um esforço para a sustentabilidade global (SAUCIER, 2016). Sua importância como fonte de doenças transmitidas por alimentos é uma preocupação e o controle por meio da cadeia de fornecimento é apoiado por conceitos de gerenciamento de risco (FEGAN e JESON, 2018). As técnicas utilizadas na conservação de alimentos incluem métodos físicos, químicos e biológicos.

Os inícios das técnicas de conservação de alimentos emergiram em 500 anos a.C. com o processo de preservar alimentos com sal, e progrediu muito depois, em meados do século XIX, com o uso de blocos de gelo e unidades contendo gelo, antiga forma de refrigeração. Em 1864, o avanço da preservação de alimentos baseada na ciência deu um salto significativo com o desenvolvimento da pasteurização, e quase 100 anos depois, o processo de irradiação permitiu

que a comida ficasse estável por várias décadas. Perto do final do século 20, no entanto, muitos consumidores consideraram os alimentos irradiados insalubres, e a demanda do consumidor por

Tabela 1 – Estudos mundiais com substâncias com ação na inibição do biofilme de bactérias de importância na indústria de alimentos nos últimos 5 anos.

Micro-organismo	Antibiofilme	Fonte
<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Punica granatum</i> L. e <i>Rhus coriaria</i> L.	Nostro et al., 2016
<i>L. monocytogenes</i>	resveratrol (3,5,4'-tri-hidroxi-trans-estilbeno)	Ferreira e Domingues, 2016
<i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>Leu. Mesenteroides</i>	Isoeugenol	Nielsen et al., 2017
<i>S. aureus</i>	<i>Syzygium aromaticum</i> e <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Budri et al., 2015
<i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>S. aureus</i>	leptospermona, carvacrol, pcymentene, timol, cinamaldeído	Pedonese et al., 2017
<i>Chromobacterium violaceum</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i>	Nanoestruturas de óxido de zinco da semente de <i>Nigella sativa</i>	Al-Shabib et al., 2016
<i>Acinetobacter</i> , <i>Sphingomonas</i> e <i>Stenotrophomonas</i>	Óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Cinnamomum verum</i> e <i>Origanum vulgare</i>	Szczepanski e Lipski, 2014
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cinamaldeído e linalol em combinação com Dnase bacteriana	Banu et al., 2018
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538), <i>E. coli</i> (ATCC 35218) e <i>S. enteritidis</i> (ATCC 14028)	<i>Dodartia orientalis</i> L.	Wang et al., 2017
<i>Vibrio</i> spp.	Óleo essencial de <i>Mentha spicata</i> L.	Snoussi et al., 2015
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 15313), and <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	<i>Copaifera</i> spp.	Fernandéz et al., 2018
<i>E. coli</i>	Ácido gálico	Kang et al., 2018
<i>S. aureus</i> MRSA	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	Silva et al., 2015

alimentos frescos aumentou, os minimamente processados e alimentos naturais como leite cru e sucos não pasteurizados. Isso trouxe desafios à segurança alimentar (BYRD-BREDBENNER et al., 2015).

Os produtos cárneos fermentados tem em sua formulação, culturas *starters*, bactérias ácido lácticas que agem reduzindo o pH do alimento conferindo características sensoriais ao produto, esse fator associado a baixa atividade de água (Aa) inativam micro-organismos patogênicos (LEROY et al., 2013).

O processo de irradiação de alimentos está regulamentado no Brasil segundo a RDC 21/2001 (BRASIL, 2001), sendo uma técnica capaz de eliminar ou reduzir micro-organismos patogênicos e deteriorantes, incluindo *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, levedura e mofo (STEFANOVA et al., 2011). Todavia, essa tecnologia ainda tem um entrave com sua aceitação pelo consumidor. Crowley et al. (2013) em pesquisa de campo, identificaram que existe uma necessidade de divulgação dos benefícios e riscos do processo, na verdade, a população desconhece essas particularidades e faz uma relação negativa com o termo radiação.

Outro processo físico que vem sendo estudado para eliminar microrganismos de alimentos é o ultrassom de alta intensidade (USI). Essa técnica oferece uma alternativa aos métodos tradicionais de preservação de alimentos e é considerado uma tecnologia emergente, verde e promissora. Desenvolve forças físicas que são consideradas o principal mecanismo responsável pelas mudanças nos materiais expostos (DUARTE et al., 2018).

Na carne, ultrassom tem sido usado com sucesso para melhorar processos como transferência de massa emarinação, amaciamento de carne e inativação de microrganismos. A eficiência do ultrassom varia entre os estudos devido a diferenças nos parâmetros, como frequência, tempo e temperatura de aplicação, protocolos de tratamento, desenho experimental, tipo de amostra de carne (carne, aves ou carne de porco / pele ou músculo), espécies e estirpes de microrganismos, além disso, a combinação de energia ultrassônica com um agente desinfetante pode melhorar o efeito de redução microbiana de alimentos (TURANTAS et al., 2015; ALARCON-ROJO et al., 2018). Birk et al. (2010) avaliaram melhores resultados do tratamento com USI junto com imersão de carne suína em vinho tinto na redução de *L. monocytogenes*, *B. thermosphacta* e *C. jejuni*, do que o processo de USI isoladamente. Caraveo et al. (2015) não observaram diferenças nas características físico-químicas de carnes tratadas com USI, porém foi observado a redução do crescimento microbiano. Além de efeitos antimicrobianos, o USI pode melhorar tecnologias como o processo de cura de carnes, os

tornando mais eficientes (McDONNELL et al., 2014). Porém, a maioria dos estudos demonstra que a tecnologia de USI tem o objetivo de melhorar os efeitos associando-se a outras técnicas.

Os conservantes químicos estão inseridos no decreto nº 50.040/61 (BRASIL, 1961) e definem-se como, substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas. Seu uso e limites máximos permitidos para produtos cárneos estão dispostos na resolução nº 272/2019 (BRASIL, 2019). Os principais agentes usados na conservação de produtos cárneos são os sais de nitrito, porém esses compostos são tidos como genotóxicos e cancerígenos (QUIST et al., 2018; ALIPANAH\_MOGHADAM et al., 2017).

Os sais de nitrito e nitrato de sódio e potássio são os principais agentes nitrosantes responsáveis pela formação de compostos N-nitrosos carcinogênicos (NOCs). As frutas e verduras são fontes naturais de compostos nitrosos que são catalisados e absorvidos antes de entrarem em contato com o cólon, porém um pH gástrico aumentado pode estimular a formação de NOCs, bem como a proteína heme presente em carnes vermelhas pode servir como transportador de precursores nitrosantes para o cólon e influenciar a flora microbiana, permitindo mais formação de NOC. Além disso, a formação de NOC no cólon também é aumentada por geração endógena de N-nitroso (NO) devido a doenças intestinais inflamatórias (JUN KOBAYASHI, 2018). Logo, o câncer de cólon e reto são os de maior importância associados ao consumo de nitrato, ferro heme e aminas heterocíclicas de carnes vermelhas (CROSS et al., 2010).

Logo, os riscos de câncer associados ao consumo de carne processada com adição de nitrato como conservante, estão recebendo muita atenção, conseqüentemente, produtos inovadores estão sendo desenvolvidos com níveis reduzidos ou nulos de nitrato, como exemplo, os fitoquímicos estão atualmente sob investigação por seu potencial antimicrobiano. Os consumidores estão se tornando mais conscientes dos aspectos de saúde dos alimentos consumidos, uma tendência que é acompanhada por um aumento nas alegações de saúde sobre produtos alimentícios (STRIJBOS et al., 2016).

Produtos naturais como extratos de plantas e óleos essenciais são amplamente estudados para utilização como conservantes de alimentos (Tabela 2), bem como estudos com produtos naturais adicionados a embalagens biodegradáveis e comestíveis. Outras substâncias também têm sido estudadas, a exemplo da quitosana, polissacarídeo extraído de esqueleto de crustáceos que tem atraído interesse como conservante de alimentos pela sua característica não tóxica, com alguns estudos sugerindo seu uso em embalagens (CESUR et al., 2018; KHEZRIAN e SHAHBAZI, 2018; RIAZ et al., 2018). Como conservantes de peixes apresentou efeito

inibitório sobre a *Shewanella* spp. (HE et al., 2017). Também possibilitou aumento da vida de prateleira de salame suíno quando em sinergismo com extrato de hortelã, reduzindo a contagem total de bactérias e rancidez oxidativa (KANATT et al., 2008).

Tabela 2 – Estudos sobre ação antibacteriana de produtos naturais em carne e seus derivados entre os anos de 2014 a 2018.

Produto	Ação/Micro-organismo	Autor
Extrato aquoso de <i>Lawsonia inermis</i>	- Redução de contagem de bactérias psicrotrofilas	Jridi et al., 2018
Extrato de <i>Humulus lupulus</i>	- Diminuição da proteólise - Inibição de <i>L. monocytogenes</i> em carne suína marinada	Kramer et al., 2014
Carvacrol e óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i>	- Inibição de <i>E. coli</i> em carne em armazenamento a 4 °C	Stratakos e Grant, 2018
Extrato de <i>Malpighia Punicifolia</i>	- Inibição de <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. fragi</i> , and <i>B. thermosphacta</i> em bifes de búfalo em armazenamento a 4 °C/21 dias	Tremont et al., 2016
Óleo essencial de <i>Azadirachta indica</i>	- Inibição de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. fluorescences</i> , <i>L. curvatus</i> e <i>L. sakei</i> em carne embalada à vácuo em armazenamento a 10°C/12 dias	Serrone et al., 2015
Óleo essencial de <i>Citrus lemon</i>	- Inibição de <i>L. monocytogenes</i> em carne bovina picada armazenada a 4°C.	Hsouna et al., 2017
Óleo essencial de <i>Mentha-piperita</i> em associação com bacteriocina semi-purificada BacTN635	-Redução da contagem bacteriana total, de enterobacteriaceas e <i>Pseudomonas</i> spp. em carne bovina picada armazenada a 4°C/21 dias.	Smaoui et al., 2016
Microcapsulas de óleo de <i>Syzygium aromaticum</i>	- Atividade antifúngica e estabilidade térmica em carne cozida	Wang et al., 2018
Revestimento a base de óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	- Inibição da carga microbiana	Catarino et al., 2017
Óleo essencial de <i>Ocimum basilicum</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	- Inibição de <i>S. enteritidis</i> em carne de frango crua e tratada termicamente	Stojanovic-Radic et al., 2018

Peptídeos obtidos a partir da hemoglobina purificada de subprodutos de abatedouro bovinos foram eficientes na redução da rancidez oxidativa e crescimento microbiano por 14 dias em temperaturas de refrigeração em carne (PRZYBYLSKI et al., 2016).

Bacteriocinas, metabólitos produzidos por bactérias ácido lácticas (BAL), são muito utilizadas na indústria alimentícia, e muitas têm apresentado efeito ativo contra patógenos microbianos, apresentando um valor agregado como conservante. Observa-se melhores resultados quando as bacteriocinas são adicionadas diretamente ao produto, principalmente quando as condições do alimento não são favoráveis a produção desses metabólitos. Embalagens elaboradas com incorporação de bacteriocinas apresentam um novo nicho para estudos na área (AHMAD et al., 2017; WORAPRAYOTE et al., 2016).

Observou-se que vários são os estudos com agentes antimicrobianos inovadores para produtos cárneos, porém nenhum método de conservação tem se mostrado 100% eficiente isoladamente para evitar contaminação microbiana. Para carne *in natura* a embalagem à vácuo ou com atmosfera modificada e a cadeia do frio agem em conjunto para aumentar o prazo de prateleira. Já para os derivados e subprodutos, outros métodos podem ser empregados.

## **2.5 AZO COMPOSTOS E SUA UTILIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS**

Alguns aditivos alimentares podem apresentar mais de uma ação sobre o alimento, dessa forma diminuir a quantidade de substâncias adicionadas e reduzir seus efeitos sobre a saúde do consumidor. Os azo compostos são amplamente utilizados como corantes sintéticos em alimentos, não apenas para torná-los atraentes visualmente, mas também para restabelecer a aparência original perdida durante o processo de produção (YAMJALA et al., 2016). A maioria dos corantes obtidos de fontes naturais é instável e pode sofrer degradação facilmente durante o processamento de alimentos. Portanto, corantes de origem sintética são amplamente utilizados, não apenas por causa de sua estabilidade, mas também pelo custo de produção ser muito baixo quando comparado com corantes de origem natural (TIMBERLAKE, BRIDLE e WALFORD, 1980). Os azo compostos estão descritos na legislação brasileira como corante orgânico sintético idêntico ao natural, cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural (BRASIL, 1977) e os de uso permitido no Brasil estão expostos na tabela 3, bem como os Níveis Máximos Permitidos, Segundo o *Codex Alimentarius* (WHO, 2018). Porém nenhum desses está autorizado para uso em produtos cárneos.

Tabela 3 – Azo compostos com uso permitido no Brasil com suas numerações de referência e limites de uso tolerável segundo o *Codex Alimentarius*

Corante (nome usual)	Código no Brasil	INS (Codex)	Nível Máximo Permitido
Tartrazina	E-102	102	100 mg/kg
Amarelo crepúsculo	E-110	110	300 mg/kg
Azorrubina	E-122	122	150 mg/kg
Amaranto	E-123	123	50mg/kg
Ponceu 4R	E-124	124	150 mg/kg
Vermelho 40	E-129	129	300 mg/kg

INS – Sistema de Numeração Internacional

A cor de uma forma ou de outra foi adicionada aos nossos alimentos durante séculos. Sabe-se que os egípcios coloriam doces e vinho há muito tempo, 400 anos a.C. A indústria de alimentos em desenvolvimento tinha disponível uma vasta gama de cores sintéticas no final do século XIX. Isso levou à adição de cores para fins decorativos e, infelizmente, para disfarçar alimentos de baixa qualidade (DOWNHAM e COLLINS, 2001).

Os compostos azo são corantes orgânicos sintéticos, caracterizados por grupos azo (R1–N=N–R2) como parte de sua estrutura e constituem cerca de 65% dos corantes utilizados na indústria de alimentos, porém, alguns desses compostos tem sido relacionados a efeitos tóxicos no consumidor, por isso, nas últimas décadas o seu uso tem sido altamente regulamentado pelos órgãos de fiscalização (YAMJALA et al., 2016). Entretanto, são extremamente úteis e também fazem parte da nossa rotina diária, como corantes alimentares, corantes empregados na medicina, no setor de cosméticos, na indústria têxtil ou como produtos químicos de laboratório (seja em análise ou em pesquisa para coloração de biomoléculas) (GANGULY et al., 2014), dessa forma, a continuidade dos estudos tem sido importante para garantia de seu uso, além das pesquisas que avaliam a redução da toxicidade desses compostos alguns autores relatam sua atividade antimicrobiana e antibiofilme, esses dados estão expostos na tabela 4.

Ganguly et al. (2014), estudando 5-amino-2-((3-hidroxi-4 - ((3-hidroxifenil) fenil) diazenil) fenol (AHPD), um composto contendo duas ligações azo e seu complexo dimérico de Cu (II) frente as cepas bacterianas *E. coli* e *S. aureus*, revelaram que o complexo apresentou menor efeito tóxico, ou seja, a formação complexa de compostos azo pode ser um meio para controlar a formação de amins responsáveis pela citotoxicidade. O efeito antimicrobiano do complexo Cu (II) de 2-hidroxifenil-azo-2-naftol (HPAN) foi avaliado frente *B. subtilis* e *E. coli* apresentando resultados satisfatórios e provável redução da resitência microbiana. Essa formação complexa de azocomposto com cobre é capaz de modular a citotoxicidade e reduzir os efeitos tóxicos associados a ação do composto (DEB et al., 2018).

Tabela 4 – Estudos sobre ação antimicrobiana e antibiofilme de azo compostos nos últimos 10 anos.

Micro-organismo	Antimicrobiano/Antibiofilme	Fonte
<i>E. coli</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	2-hidroxifenil-azo-2'-nafitol	Deb et al. 2018
<i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	5-amino-2- ((3-hidroxi-4-((3-hidroxifenil) fenil) diazenil) fenol	Ganguly et al, 2014
<i>S. aureus</i> e <i>M. luteus</i>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> N <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	Karabacak et al., 2015
<i>S. aureus</i>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>9</sub> O	Karabacak et al., 2015
<i>M. luteus</i>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>9</sub> O	Karabacak et al., 2015
<i>L. monocytogenes</i> , <i>M. luteus</i> e <i>E. faecalis</i>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> N <sub>9</sub> O	Karabacak et al., 2015
<i>L. monocytogenes</i> e <i>M. luteus</i>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>9</sub> O	Karabacak et al., 2015
<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>M. luteus</i>	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> N <sub>9</sub> O	Karabacak et al., 2015
<i>S. aureus</i> e <i>M. luteus</i>	C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> N <sub>9</sub> O	Karabacak et al., 2015
<i>S. aureus</i>	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>9</sub> O	Karabacak et al., 2015
<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. faecalis</i> e <i>B. subtilis</i>	1-(4-Metilfenilazo)-2-nafitol	Mkpenie et al., 2008
<i>S. aureus</i>	4-hidroxi-3,5- dimetilazobenzeno	Concilio et al, 2017
<i>C. albicans</i>	4'-hidroxi-4-metilazobenzeno	Concilio et al, 2017
<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4-((4-(isopentiloxi) fenil) diazenil)-2,6-dimetilfenol</li> <li>• 4-((4-(neopentiloxi) fenil) diazenil)benzeno-1,3-diol</li> <li>• 4-((4-(isopentiloxi) fenil) diazenil) benzeno-1,3-diol</li> </ul>	Piotto et al., 2017

Adegoke et al. (2014) avaliaram a genotoxicidade de quatro corantes azo em camundongos, e observaram que os danos ao DNA só ocorreram quando da administração de altas dosagens, com danos cromossômicos mínimos e sem apresentar citotoxicidade. Pioto et al.

(2013) projetaram em análise computacional derivados azobenzenos com baixa toxicidade e efeito antimicrobiano com potencial para uso na indústria alimentícia.

Rana et al. (2018) encontraram resultados de efeitos tóxicos para diferentes tipos de corantes azoicos, sendo que o 4-(fenildiazenil) fenol não apresentou toxicidade em várias concentrações testadas, já o 5-(fenildiazenil) quinolin-8-ol exibiu sobrevivência celular de 90% em concentração a 2mM, porém concentrações mais altas tiveram efeito tóxico. Logo, o efeito tóxico dos azocompostos não são iguais a todos e existem mecanismos viáveis de redução quando o mesmo é comprovado. O uso desses aditivos sintéticos é viável pela sua facilidade de produção e estabilidade, não sofrendo degradação no processamento de alimentos.

O uso dos compostos azo para outros fins, também tem sido estudado. Vários autores tem demonstrado a ação antimicrobiana dessas moléculas. Yousefi et al. (2012) identificaram inibição de *E. coli*, *B. subtilis*, *Micrococcus leuteus* e *P.aeruginosa* frente a oito corantes azo, e os resultados diferiram entre eles apenas na concentração bactericida utilizada.

Por outro lado, Fondjo et al. (2016) obtiveram baixas concentrações bactericida mínima de um composto azo frente a *Shigella flexneri* e *E. coli*. O efeito antimicrobiano do 2-naftol foi aumentado quando na presença de um grupo azo (azo-2-naftol), tendo uma contribuição de 60% na ação contra *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. faecalis* (MKPENIE et al., 2008). Logo, esses compostos têm potencial para serem utilizados como antimicrobianos na indústria de alimentos, reduzindo ou eliminando a quantidade de sais de nitrito quando adicionados nas formulações de produtos cárneos derivados.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar um azo composto com atividade antimicrobiana e potencial aplicação como conservante em produtos cárneos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias de carne caprina e ovina comercializadas em mercados públicos;
- Identificar o potencial antimicrobiano dos azo compostos frente as bactérias isoladas;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme das bactérias isoladas;
- Identificar a capacidade dos azo compostos na inibição de biofilme;
- Estabelecer os níveis de redução da CBM do nitrito de sódio em sinergismo com o azo composto;
- Investigar o mecanismo de ação do azo composto em enzimas ligadas a atividade antimicrobiano;
- Analisar o efeito tóxico do azo composto e do nitrito de sódio em *Artemia salina*;
- Determinar a vida de prateleira de linguiça de cordeiro após adição do azo composto;
- Verificar as alterações físico-químicas e microbiológicas em amostras de linguiça de cordeiro contaminadas com *S. aureus* e não contaminadas;

#### 4. REFERÊNCIAS

ADEGOKE, O. A.; GHOSH, M.; MANIVANNAN, J.; SINHA, S.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity evaluation of 4-carboxyl-2,6-dinitrophenylazohydroxynaphthalenes in mice. **Toxicology & Industrial Health**, v. 30, n. 5, p. 393-405, 2014.

ADETUNJI, V. O.; ADEDEJI, A. O.; KWAGA, J. Assessment of the contamination potentials of some foodborne bacteria in biofilms for food products. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, p. S232-S237, 2014.

AHMAD, V.; KHAN, M. S.; JAMAL, Q. M. S.; ALZOHAIRY, M. A.; AL KARAAWI, M. A.; SIDDIQUI, M. U. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, p. 1-11, 2017.

ALARCON-ROJO, A.D.; CARRILLO-LOPEZ, L.M.; REYES-VILLAGRANA, R.; HUERTA-JIMÉNEZ, M.; GARCIA-GALICIA, I.A. Ultrasound and meat quality: A Review, **Ultrasonics Sonochemistry**, 2018, *in press*.

ALIPANAH\_MOGHADAM, R.; HOSSEINZADEH, S.; NEMATI, A.; BAGHI, A. N.; MALEKZADEH, V. Comparison of Dietary Habits and Serum Nitrate Levels in Patients with Esophageal Cancer and Healthy Individuals. **Journal of Ardabil University of Medical Sciences**, v.17, n. 2, p. 241-251, jul 2017.

AL-SHABIB, N. A.; HUSAIN, F. M.; AHMAD, I.; KHAN, M. S.; KHAN, R. A.; KHAN, J. M. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 79, p. 325-332, 2017.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751-1773, 2010.

BANU, S. F.; RUBINI, D.; MURUGAN, R.; VADIVEL, V.; GOWRISHANKAR, S.; PANDIAN, S. K.; NITHYANAND, P. Exploring the antivirulent and sea food preservation efficacy of essential oil combined with DNase on *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Science and Technology**, v. 95, p. 107-115, 2018.

BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, v. 120, p. 118-132, 2016.

BIRK, T.; GRØNLUND, A. C.; CHRISTENSEN, B. B.; KNØCHEL, S.; LOHSE, K.; ROSENQUIST, H. Effect of Organic Acids and Marination Ingredients on the Survival of *Campylobacter jejuni* on Meat. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p. 258-265, feb. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, 2017. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/Decreto/D9013.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/Decreto/D9013.htm). Acesso: nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2018 Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf> Acesso em: 02/11/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 3 maio 1999. Seção 1. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=11297&mode=PRINTVERSION>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 272, de 14 de março de 2019. Estabelece os aditivos alimentares autorizados para uso em carnes e produtos cárneos. Diário Oficial da União, Brasília, 18 março 2019. Disponível em: < [http://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/67378977/do1-2019-03-18-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-272-de-14-de-marco-de-2019-67378770](http://www.in.gov.br/web/guest/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/67378977/do1-2019-03-18-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-272-de-14-de-marco-de-2019-67378770)> Acesso em 09/07/2019.

BRASIL, 1999 Resoluções nº 382 a 388, de 9 de agosto de 1999 - ANVISA.

BRASIL, Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos Resolução CNNPA Nº 17, DE 9 DE MAIO DE 1977. Acesso em: 24 de abril de 2019. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnnpa/1976/res0017\\_09\\_05\\_1977.html](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnnpa/1976/res0017_09_05_1977.html)>. Acesso em 21 abril 2019.

RESOLUÇÃO - CNNPA CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos Nº 44, DE 1977.

BUDRI, P. E.; SILVA, N. C. C.; BONSAGLIA, E. C. C. R.; FERNANDES JÚNIOR, A.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P.; DOYAMA, J. T.; GONÇALVES, J. L.; SANTOS, M. V.; FITZGERALD-HUGHES, D.; RALL, V. L. M. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, 2015.

BYRD-BREDBENNER, C.; COHN, M. N.; FARBER, J. M.; HARRIS, L. J.; ROBERTS, T.; SALIN, V.; SINGH, M.; JAFERI, A.; SPERBER, W. H. Annals of the new york academy of sciences 2015, 1347, 29–44.

CARAVEO, C.; ALARCON-ROJO, A. D.; RENTERIA, A.; SANTELLANO, E.; PANIWNKY, L. Physicochemical and microbiological characteristics of beef treated with CARCEL, J. A.; BENEDITO, J.; BOM, J.; MULET, A. High intensity ultrasound effects on meat brining. **Meat Science**, v. 76, p. 611–619, 2007.

CATARINO, M. D.; ALVES-SILVA, J. M.; FERNANDES, R. P.; GONÇALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. R.; HENRIQUES, M. F.; CARDOSO, S. M. Development and performance of whey protein active coatings with *Origanum virens* essential oils in the quality and shelf life improvement of processed meat products. **Food Control**, v. 80, p. 273-280, 2017.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States. <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf>, 2013.

CDC, 2018. Centers for Disease Control and Prevention – CDC - Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2016, Annual Report. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2018.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention - CDC - Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 1998-2002. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) November, 2006. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm>> Acesso em: 28 de novembro de 2018.

CESUR, S.; KÖROĞLU, C.; YALÇIN, H. T. Antimicrobial and biodegradable food packaging applications of polycaprolactone/organo nanoclay/ chitosanpolymeric composite films. **Journal of Vinyl and Additive Technology**, v. 24, n. 4, p. 376-387, 2018.

CHAGNOT, C.; CACCIA, N.; LOUKIADIS, E.; GANET, S.; DURAND, A.; BERTIN, Y.; TALON, R.; ASTRUC, T.; DESVAUX, M. Colonization of the meat extracellular matrix proteins by O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 188, p. 92–98, 2014.

CHATURONGKASUMRIT, Y.; TAKAHASHI, H.; KEERATIPIBUL, S.; KUDA, T.; KIMURA, B. The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1893–1899, 2011.

CHIA, T.; GOULTER, R.; MCMEEKIN, T.; DYKES, G.; FEGAN, N. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 853–859, 2009.

CHOPRA, L.; SINGH, G.; JENA, K. K.; SAHOO, D. K. Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-13, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS GENERAL STANDARD FOR FOOD ADDITIVES CODEX STAN 192-1995 Revision 2018.

CORCORAN, M.; MORRIS, D.; DE LAPPE, N.; O’CONNOR, J.; LALOR, P.; DOCKERY, P.; CORMICANA, M. Commonly Used Disinfectants Fail To Eradicate *Salmonella enterica* Biofilms from Food Contact Surface Materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1507–1514, 2014.

COSSU, A.; SI, Y.; SUN, G.; NITIN, N. Antibiofilm effect of poly (vinyl alcohol-coethylene) halamine film against *Listeria innocua* and *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, p. 1-12, 2017.

COSTA, L.O. Processamento e Diminuição do Reprocesso do Hambúrguer Bovino (HBV). 2004. 127 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos)-Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2004.

COSTA, R.G.; CARTAXO, F.Q; SANTOS, N.M.; QUEIROGA, R.C.R..Egypto. Carne caprina e ovina: composição lipídica e características sensoriais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.3, p. 497-506, 2008.

CROSS, A. J.; FERRUCCI, L. M.; RISCH, A.; GRAUBARD, B. I.; WARD, M. H.; PARK, Y.; HOLLENBECK, A. R.; SCHATZKIN, A.; SINHA, R. A Large Prospective Study of Meat Consumption and Colorectal Cancer Risk: An Investigation of Potential Mechanisms Underlying this Association. **Cancer Research**, v. 70, n. 6, p. 2406-2414, 2010.

CROWLEY, O. V.; MARQUETTE, J.; REDDY, D.; FLEMING, R. Factors predicting likelihood of eating irradiated meat. **Journal of Applied Social Psychology**, v. 43, p. 95–105, 2013.

DEB, T.; GANGULY, D.; SEN, S.; GIRI, P.; DHAR, P.; DAS, S. Modification of the toxicity of an azo compound through complex formation help target bacterial strains. **Journal of Chemical Science**, v. 130, n. 94, p. 1-9, 2018.

DHAMA, K.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; SHABBIR, U. Z.; BARBUDDHE, S.; MALIK, S. V. S.; SINGH, R. K. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 211-235, 2015.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science Technology**, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2001.

DUARTE, A. L. A.; ROSÁRIO, D. K. A.; OLIVEIRA, S. B. S.; SOUZA, H. L. S.; CARVALHO, R. V.; CARNEIRO, J. C. S.; SILVA, P. I.; BERNARDES, P. C. Ultrasound improves antimicrobial effect of sodium dichloroisocyanurate to reduce *Salmonella* Typhimurium on purple cabbage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 269, p. 12-18, 2018.

ELMALI, M.; CAN, H. Y.; YAMAN, H. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 672-675, 2015.

ESMAEILI, H.; RAHMANI, H.K. Detection of *Salmonella* Carriers in Sheep and Goat Flocks of Bushehr and Lorestan Provinces, Iran. **Journal of Medical Bacteriology**, v. 5, n. 3, p. 50-53, sep. 2016.

ETEMADI, A.; ABNET, C. C.; GRAUBARD, B. I.; BEANE-FREEMAN, L.; FREEDMAN, N. D.; LIAO, L.; DAWSEY, S. M.; SINHA, R. Anatomical subsite can modify the association between meat and meat compounds and risk of colorectal adenocarcinoma: Findings from three large US cohorts. **International Journal of Cancer**, v. 143, n. 9, p. 2261-2270, nov. 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Meat and Meat Products. Março/2019. Disponível em

<[http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr\\_productions.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_productions.html)> Acesso em 08/07/2019.

FEGAN, N.; JENSON, I. The role of meat in foodborne disease: Is there a coming revolution in risk assessment and management? **Meat Science**, v. 144, p. 22-29, 2018.

FERNÁNDEZ, Y. A.; DAMASCENO, J. L.; ABRÃO, F.; SILVA, T. S.; CÂNDIDO, A. L. P.; FREGONEZI, N. F.; RESENDE, F. A.; RAMOS, S. B.; AMBROSIO, S. R.; VENEZIANI, R. C. S.; BASTOS, J. K.; MARTINS, C. H. G. Antibacterial, Preservative, and Mutagenic Potential of Copaifera spp. Oleoresins Against Causative Agents of Foodborne Diseases. **Foodborne Pathogens and Disease**. *in press*, 2018.

FERREIRA, S.; DOMINGUES, F. The antimicrobial action of resveratrol against *Listeria monocytogenes* in food-based models and its antibiofilm properties. **Journal of Science Food Agriculture**, v.96, p. 4531–4535, 2016.

FONDJO, E. S.; SORELA, D. D. K.; JEAN-DE-DIEUB, T.; JOSEPHA, T.; SYLVIANA, K.; DORIANEA, N.; RODOLPHEA, C. J.; PEPINA, N.; JULES-ROGERB, K.; ARNAUDC, N. N.; LUCAS, S. B. Synthesis, Characterization, Antimicrobial and Antioxidant Activities of The Homocyclotrimer Of 4-Oxo-4h-Thieno[3,4-C]Chromene-3-Diazonium Sulfate. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 10, p. 21-32, 2016.

GANGULY, D.; SARKAR, R.; SANTRA, R. C.; DEB, T.; SEM, T.; DAS, S. Synthesis and characterization of 5-amino-2-((3-hydroxy-4-((3-hydroxyphenyl) phenyl) diazenyl) phenol and its Cu(II) complex – a strategy toward developing azo complexes for reduction of cytotoxicity. **Complex Metals**, v. 1, n.1, p. 13-22, 2014.

GRANDINI, A.; AKIN, M.; CELLINI, L.; BISIGNANO, G.; SARAÇOĞLU, H. T. In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 238, p. 33-39, 2016.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p.77–87, 2009.

GUILBAUD, M.; PIVETEAU, P.; DESVAUX, M.; BRISSE, S.; BRIANDET, R. Exploring the diversity of *Listeria monocytogenes* biofilm architecture by high-throughput confocal laser scanning microscopy and the predominance of the honeycomblike morphotype. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p.1813–1819, 2015.

HE, M.; GUO, Q.; SONG, W.; LI, B., ZHANG, G. Inhibitory effects of chitosan combined with nisin on *Shewanella* spp. isolated from *Pseudosciaena crocea*. **Food Control**, v. 79, p. 349-355, 2017.

HECKE, T. V.; VOSSEN, E.; HEMERYCK, L. Y.; BUSSCHE, J. V.; VANHAECKE, L.; DE SMET, S. Increased oxidative and nitrosative reactions during digestion could contribute to the association between well-done red meat consumption and colorectal cancer. **Food Chemistry**, v. 187, p. 29-36, 2015.

HENNEKINNE, J.; BUYSER, M.; DRAGACCI, S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 815-836, 2012.

HOFFMANN, S.; DEVLEESSCHAUWER, B.; ASPINALL, W.; COOKE, R.; CORRIGAN T.; HAVELAAR, A.; ÂNGULO, F.; GIBB, H.; KIRK, M.; LAKE, R.; SPEYBROECK, N.; TORGERSON, P.; HALD, T. Attribution of global foodborne disease to specific foods: Findings from a World Health Organization structured expert elicitation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1-26, 2017.

HSOUNA, A. B.; HALIMA, N. B.; SMAOUI, S.; HAMDI, N. Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 146, aug, 2017.

IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. 2012. Disponível na Internet: <http://www.sidra.ibge.gov.br>, capturado em 29/11/2018, On line.

JRIDI, M.; MORA, L.; SOUISSI, N.; ARISTOY, M. C.; NASRI, M.; TOLDRÁ, F. Effects of active gelatin coated with henna (*L. inermis*) extract on beef meat quality during chilled storage. **Food Control**, v. 84, p. 238-245, 2018.

JUN KOBAYASHI, M. D. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of N-nitroso compounds: A review. **Nitric Oxide**, v. 73, p. 66-73, 2018.

KANATT, S. R.; CHANDER, R., SHARMA, A. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, v. 107, p. 845–852, 2008.

KANG, J.; QIANQIAN, L.; LIU, L.; WENYUAN, J.; JINGFAN, W.; YUYANG, S. The specific effect of gallic acid on *Escherichia coli* biofilm formation by regulating pgaABCD genes expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1837-1846, 2018.

KARVE, S. S.; PRADHAN, S.; WARD, D. V.; WEISS, A. A. Intestinal organoids model human responses to infection by commensal and Shiga toxin producing *Escherichia coli*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. 1-20, 2017.

KHEZRIAN, A.; SHAHBAZI, Y. Application of nanocomposite chitosan and carboxymethyl cellulose films containing natural preservative compounds in minced camel's meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1146-1158, 2018.

KIM, H. J.; OH, T.; BAEK, S. Multidrug Resistance, Biofilm Formation, and Virulence of *Escherichia coli* Isolates from Commercial Meat and Vegetable Products. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2018. *In Press*.

KRAMER, B.; THIELMANN, J.; HICKISCH, A.; MURANYI, P.; WUNDERLICH, J.; HAUSER, C. Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, p. 648-657, 2014.

KRONING, I. S.; IGLESIAS, M. A.; SEHN, C. P.; GANDRA, T. K. V.; MATA, M. M.; PADILHA DA SILVA, W. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: Biofilm

formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v. 58, p. 105-111, 2016.

LEROY, F.; GEYZEN, A.; JANSSENS, M.; VUYST, L. D.; SCHOLLIERS P. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p. 130–137, 2013.

LEVY-COSTA, R.B; SICHIERI, R.; PONTES, N.S.; MONTEIRO, C.A. Disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil: distribuição e evolução (1974-2003). *Rev Saúde Públ.* 2005;39(4):530-40. Disponível em: <http://www.scielo.org/pdf/rsp/v39n4/25522.pdf>. Acesso em nov. de 2018.

LI, J.; FENG, J.; MA, L.; NÚÑEZ, C. F.; GÖLZ, G.; LU, X. Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 253, p. 20-28, 2017.

LUCHIARI FILHO, A. Produção de carne bovina no Brasil qualidade, quantidade ou ambas? II SIMBOI - Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte, p.1-10, Brasília-DF, 2006. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Luchiari\\_Albino/publication/237404396\\_PRODUCAO\\_DE\\_CARNE\\_BOVINA\\_NO\\_BRASIL\\_QUALIDADE\\_QUANTIDADE\\_OU\\_AMBAS/links/53fe13900cf23bb019bd700c/PRODUCAO-DE-CARNE-BOVINA-NO-BRASIL-QUALIDADE-QUANTIDADE-OU-AMBAS.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Luchiari_Albino/publication/237404396_PRODUCAO_DE_CARNE_BOVINA_NO_BRASIL_QUALIDADE_QUANTIDADE_OU_AMBAS/links/53fe13900cf23bb019bd700c/PRODUCAO-DE-CARNE-BOVINA-NO-BRASIL-QUALIDADE-QUANTIDADE-OU-AMBAS.pdf). Acesso em 29/11/2018.

MARTI, R.; SCHMID, M.; KULLI, S.; SCHNEEBERGER, K.; NASKOVA, J.; KNØCHEL, S.; AHRENS, C. H.; HUMMERJOHANN, J. Biofilm formation potential of heat-resistant *Escherichia coli* dairy isolates and the complete genome of multidrug-resistant, heat-resistant strain FAM21845. **Applied and Environment Microbiology**, v. 83, n. 15, p. 1-20, 2017.

MAURY, M. M.; TSAI, Y.; CHARLIER, C.; TOUCHON, M.; CHENAL-FRANCISQUE, V.; LECLERCQ, A.; CRISCUOLO, A.; GAULTIER, C.; ROUSSEL, S.; RISABOIS, A.; DISSON, O.; ROCHA, E. P. C.; BRISSE, S.; LECUIT, M. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity, **Nature Genetics**, v. 48, n. 3, 2016.

MCDONNELL, C. K.; ALLEN, P.; MORIN, C.; LYNG, J. G. The effect of ultrasonic salting on protein and water–protein interactions in meat. **Food Chemistry**, v. 147, p. 245–251, 2014.

MERINO L.; PROCURA, F.; TREJO, F. M.; BUENO, D. J.; GOLOWCZYC, M.A. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, 2017. *In Press*.

MIAO, J.; LIANG, Y.; CHEN, L.; WANG, W.; WANG, J.; LI, B.; LI, L.; CHEN, D.; XU, Z. Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: With focus on food safety. **Journal Food Safety**, v. 37, n. 4, p. 1-11, 2017.

MKPENIE, V.; EBONG, G.; OBOT, I. B.; ABASIEKONG, B. Evaluation of the Effect of Azo Group on the Biological Activity. **E-Journal of Chemistry**, v. 5, n.3, p. 431-434, jul 2008.

MONTEBELLO, N.P; ARAÚJO, W.M.C. Carne & cia. 2. ed. Brasília: Senac Distrito Federal; 2009.

NAGY, A.; MOWERY, J.; BAUCHAN, G. R.; WANG, L.; NICHOLS-RUSSELL, L.; NOU, X. Role of extracellular structures of *Escherichia coli* O157:H7 in initial attachment to biotic and abiotic surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 4720–4727, 2015.

NG, I.; ZHENG, X.; CHEN, B.; CHI, X.; LU, Y.; CHANG, C. Proteomics Approach to Decipher Novel Genes and Enzymes Characterization of a Bioelectricity-generating and Dye-decolorizing Bacterium *Proteus hauseri* ZMd44. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 8-17, 2013.

NIELSEN, C. K.; KJEMS, J.; MYGIND, T.; SNABE, T.; SCHWARZ, K.; SERFERT, Y.; MEYER, R. L. Antimicrobial effect of emulsion-encapsulated isoeugenol against biofilms of food pathogens and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 242, p. 7-12, 2017.

NOGUEIRA FILHO, A. Potencialidades da caprinovinocultura na região Nordeste do Brasil. Fortaleza: Banco do Nordeste/Etene, 2002.

NOSTRO, A.; GUERRINI, A.; MARINO, A.; TACCHINI, M.; DI GIULIO, M.; OLIVEIRA, A.B.A.; PAULA, C.M.D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M.R.I.; TONDO, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Rev HCPA**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, D.F.; COELHO, A.R.; BURGARDT, V.C.F.; HASHIMOTO, E.R.; LUNKES, A.M.; MARCHI, J.F.; TONIAL, I.B. Alternativas para um produto cárneo mais saudável: uma revisão. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 16, n. 3, p. 163-174, jul./set. 2013.

OLOKETUYI, S. F.; KHAN, F. Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms-current knowledge and future outlooks. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, p. 728–743, 2017.

OMS, 2018. The top 10 causes of death. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> 24/maio/2018

OVIDO-RONDÓN, E.O. Tecnologias para mitigar o impacto ambiental da produção de frangos de corte. **R. Bras. Zootec.**, v.37, suplemento especial p.239-252, 2008.

PAGLARINI, C.S. Utilização de extratos comerciais derivados de plantas em produtos cárneos: avaliação da atividade antioxidante. 2015. 151 f. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PEDONESE, F.; FRATINI, F.; PISTELLI, L.; MARIA PORTA, F.; P. DI CICCIO, FISCHETTI, R.; TURCHI, B.; NUVOLONI, R. Antimicrobial activity of four essential oils against pigmented *Pseudomonas fluorescens* and biofilmproducing *Staphylococcus aureus* of dairy origin. **Italian Journal of Food Safety**, v. 6, n. 6939, p. 162-166, 2017.

PETROVA, M. I.; IMHOLZ, N. C. E.; VERHOEVEN, T. L. A.; BALZARINI, J.; VAN DAMME, E. J. M.; SCHOLS, D.; VANDERLEYDEN, J.; LEBEER, S. Schols D. Lectin-Like Molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG Inhibit Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Biofilm Formation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. 1-24, 2016.

PHILIPPI, S.T. Nutrição e técnica dietética. 2. ed., rev. e atual. Barueri: Manole; 2006.

PIERCEY, M. J.; HINGSTON, P. A.; HANSEN, L. T. Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15 °C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 223, p. 63-74, 2016.

PIOTTO, S.; CONCILIO, S.; SESSA, L.; PORTA, A.; CALABRESE, E. C.; ZANFARDINO, A.; VARCAMONTI, M.; IANNELLI, P. Small azobenzene derivatives active against bacteria and fungi. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2013; 68:178-184.

PROENÇA, R.P.C. Alimentação e globalização: algumas reflexões. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.62, n.4, p.43-47, 2010.

PRZYBYLSKI, R.; FIRDAOUS, L.; CHÂTAIGNÉ, G.; DHULSTER, P.; NEDJAR, N. Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse byproduct and its potential application on meat as preservative. **Food Chemistry**, v. 211, p. 306-313, 2016.

QUIST, A. J. L.; INOUE-CHOI, M.; WEYER, P. J.; ANDERSON, K. E.; CANTOR, K. P.; KRASNER, S.; FREEMAN, L. E. B.; WARD, M. H.; JONES, R. R. Ingested nitrate and nitrite, disinfection by-products, and pancreatic cancer risk in postmenopausal women. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 2, p. 251-261, jan. 2018.

RAFII, F.; CERNIGLIA, C. E. Reduction of azo dyes and nitroaromatic compounds by bacterial enzymes from the human intestinal tract. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, p. 17-19, 1995.

RAJAN, S.; SHI, Z.; RICKE, S. C. Current aspects of *Salmonella* contamination in the US poultry production chain and the potential application of risk strategies in understanding emerging hazards. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 370-392, 2017.

REGENTHAL, P.; HANSEN, J. S.; ANDREÁ, I.; LINDKVIST-PETERSSON, K. Thermal stability and structural changes in bacterial toxins responsible for food poisoning. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1-15, 2017.

RIAZ, A.; LEI, S.; AKHTAR, H. M. S.; WAN, P.; CHEN, D.; JABBAR, S.; ABID, M.; HASHIM, M. M.; ZENG, X. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 547-555, jul 2018.

RIBEIRO, C.S.G.; CORÇÃO, M. O consumo de carne no Brasil: entre valores socioculturais e nutricionais. **Demetra**, v.8, n.3, p.425-438, 2013.

RICKE, S. C.; KIM, S. A.; SHI, Z.; PARK, S. H. Molecular-based identification and detection of *Salmonella* in food production systems: current perspectives. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, p. 313-327, 2018.

RISTORI, C. A.; ROWLANDS, R. E. G.; MARTINS, C. G.; BARBOSA, M. L.; SANTOS, L. F.; JAKABI, M.; FRANCO, B. D. G. M. Assessment of consumer exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products at retail in the city of São Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 14, n. 8, p. 447-453, 2017.

SADEKUZZAMAN, M.; MIZAN, M. F. R.; KIM, H.; YANG, S.; HA, S. Activity of thyme and tea tree essential oils against selected foodborne pathogens in biofilms on abiotic surfaces. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p.134-139, 2018.

SALAMA, P. J.; EMBAREK, P. K. B.; BAGARIA, J.; FALL, B. S. Learning from listeria: safer food for all. **The Lancet**, v. 391, p. 2305-2306, 2018.

SANTOS, E. C. C.; CASTRO, V. S.; CUNHA-NETO, A.; SANTOS, L. F.; VALLIM, D. C.; LISBÔA, R. C.; CARVALHO, R. C. T.; CONTE JUNIOR, C. A.; FIGUEIREDO, E. E. S. *Escherichia coli* O26 and O113:H21 on Carcasses and Beef from a Slaughterhouse Located in Mato Grosso, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, *in Press*, 2018.

SAUCIER, L. Microbial spoilage, quality and safety within the context of meat sustainability. **Meat Science**, v. 120, p. 78-84, 2016.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFI, P. M. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2011.

SCHÄFER, D. F.; STEFFENS, J.; BARBOSA, J.; ZENI, J.; PAROUL, N.; VALDUGA, E.; JUNGES, A.; BACKES, G. T.; CANSIAN, R. L. Monitoring of contamination sources of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 393-398, 2017.

SCHIRMER BC, LANGSRUD S. Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria *In Vitro* and in Vacuum-Packed Pork Meat. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 2, 2010.

SERENO, M. J.; ZIECH, R. E.; DRUZIANI, J. T.; PEREIRA, J. G.; BERSOT, L. S. Antimicrobial Susceptibility and Biofilm Production by *Salmonella* sp. Strains Isolated from Frozen Poultry Carcasses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 19, n. 1, p. 103-108, 2017.

SERRONE, P.; TONIOLO, C.; NICOLETTI, M. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Oil: A Natural Preservative to Control Meat Spoilage. **Foods**, v. 4, n. 1, p. 3-14, 2015.

SILVA Jr. Manual de Controle Higiênico Sanitário em Serviços de Alimentação. 6 ed. São Paulo: Ed Varela. 2008.

SILVA, D. A. L.; CAMARGO, A. C.; TODOROV, S. D.; NERO, L. A. *Listeria* spp. contamination in a butcher shop environment and *Listeria monocytogenes* adhesion ability and sensitivity to foodcontact surface sanitizers. **Journal of Food Safety**, n. 37, n. 2, p. 1-8, 2017.

SILVA, S.; COSTA, E. M.; COSTA, M. R.; PEREIRA, M. F.; PEREIRA, J. O.; SOARES, J. C.; PINTADO, M. M. Aqueous extracts of *Vaccinium corymbosum* as inhibitors of *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 51, p. 314-320, 2015.

SKOWRON, K.; GRUDLEWSKA, K.; KRAWCZYK, A.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. The effectiveness of radiant catalytic ionization in inactivation of *Listeria monocytogenes* planktonic and biofilm cells from food and food contact surfaces as a method of food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, v.0124, p. 1493-1505, 2018.

SMAOUI, S.; HSOUNA, A. B.; LAHMAR, A.; ENNOURI, K.; MTIBAA-CHAKCHOUK, A.; SELLEM, I.; NAJAH, S.; BOUAZIZ, M.; MELLOULI, L. Bio-preservative effect of the essential oil of the endemic *Mentha piperita* used alone and in combination with BacTN635 in stored minced beef meat. **Meat Science**, v. 117, p. 196–204, 2016.

SNOUSSI, M.; NOUMI, E.; TRABELSI, N.; FLAMINI, G.; PAPETTI, A.; DE FEO, V. *Mentha spicata* Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* spp. Strains. **Molecules**, v. 20, n. 08, p. 14402-14424, 2015.

SOJIC, S.; SKALJAC, S.; STOJANOVIC, P.; MIHAJLOV-KRSTEV, T. Inhibition of *Salmonella enteritidis* growth and storage stability in chicken meat treated with basil and rosemary essential oils alone or in combination. **Food Control**, v. 90, p. 332-343, 2018.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, v. 31, n. 2, p.572-585, 2013.

STEFANOVA, R.; TOSHKOV, S.; VASILEV, N. V.; VASSILEV, N. G.; MAREKOV, I. N. Effect of gamma-ray irradiation on the fatty acid profile of irradiated beef meat. **Food Chemistry**, v. 127, p. 461-466, 2011.

STOJANOVIC-RADIC, Z.; PEJCIC, M.; JOKOVIC, N.; JOKANOVIC, M.; IVIC, M.; STRATAKOS, A. C.; GRANT, I. R. Evaluation of the efficacy of multiple physical, biological and natural antimicrobial interventions for control of pathogenic *Escherichia coli* on beef. **Food Microbiology**, v. 76, p. 209-218, 2018.

STRATAKOS, A. C.; LINTON, M.; WARD, P.; CAMPBELL, M.; KELLY, C.; PINKERTON, L.; STEF, L.; PET, I.; STEF, D.; IANCU, T.; THEODORIDOU, K.; GUNDOGDU, O.; CORCIONIVOSCHI, N. The Antimicrobial Effect of a Commercial Mixture of Natural Antimicrobials Against *Escherichia coli* O157:H7. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2018. *In Press*.

STRIJBOS, C.; SCHLUCK, M.; BISSCHOP, J.; BUII, T.; DE JONG, I.; VAN LEEUWEN, M.; VON TOTTLBEN, M.; VAN BREDA, S. G. Consumer awareness and credibility factors of health claims on innovative meat products in a cross-sectional population study in the Netherlands. **Food Quality and Preference**, v. 54, p. 13-22, 2016.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v. 36, p. 224-229, 2014.

TAN, X.; HAN, Y.; XIAO, H.; ZHOU, Z. *Pediococcus Acidilactici* Inhibit Biofilm Formation of Food-Borne Pathogens on Abiotic Surfaces. **Transactions of Tianjin University**, v. 23, n. 1, p. 70-77, 2017.

TREMONT, P.; SORRENTINO, E.; SUCCI, M.; TIPALDI, L.; PANNELLA, G.; IBAÑEZ, E.; MENDIOLA, J. A.; DI RENZO, T.; REALE, A.; COPPOLA, R. Antimicrobial Effect of *Malpighia Punicifolia* and Extension of Water Buffalo Steak Shelf-Life. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 1, p. M97-M105, 2016.

TURANTAŞ, F.; KILIÇ, G. B.; KILIÇ, B. Ultrasound in the meat industry: General applications and decontamination efficiency. **International Journal of Food Microbiology**, v.198, p.59-69, 2015.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência agrotecnica**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

VENTURINI, K.S.; SARCINELLI, M.F.; SILVA, L.C. Características da carne de frango. **Boletim Técnico – PIE-UFES:01307**, p.1-7, 2007.

VIANA, J.G.A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Ano 4, Nº 12, Porto Alegre, Março de 2008.

WAKABAYASHIA, Y.; UMEDAB, K.; YONOGIA, S.; NAKAMURAB, H.; YAMAMOTOB, K.; KUMEDAC, Y.; KAWATSUA, K. Staphylococcal food poisoning caused by *Staphylococcus argenteus* harboring staphylococcal enterotoxin genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 265, p. 23-29, 2018.

WANG, F.; WEI, F.; SONG, C.; JIANG, B.; TIAN, S.; YI, J.; YU, C.; SONG, Z.; SUN, L.; BAO, Y.; WU, Y.; HUANG, Y.; LI, Y. *Dodartia orientalis* L. essential oil exerts antibacterial activity by mechanisms of disrupting cell structure and resisting biofilm. **Industrial Crops & Products**, v. 109, p. 358-366, 2017.

WANG, H.; WANG, H.; LIANG, L.; XU, X.; ZHOU, G. Prevalence, genetic characterization and biofilm formation in *vitro* of *Staphylococcus aureus* isolated from raw chicken meat at retail level in Nanjing, China. **Food Control**, v. 86, p. 11-18, 2018.

WHO, Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards FAO/WHO (2017), Food safety <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

WHO - *Codex Alimentarius*. General Standard for Food Additives CODEX STAN 192-1995, Revision 2018.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWETWIWATHANA, A.; YAMJALA, K.; NAINAR, M. S.; RAMISETTI, N. R. Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry – A review. **Food Chemistry**, v. 192, p. 813–824, 2016.

YANG, X.; NOYES, N. R.; DOSTER, E.; MARTIN, J. N.; LINKE, L. M.; MAGNUSON, R. J.; YANG, H.; GEORNARAS, I.; WOERNER, D. R.; JONES, K. L.; RUIZ, J.; BOUCHER, C.; MORLEY, P. S.; BELK, K. E. Use of Metagenomic Shotgun Sequencing Technology To Detect Foodborne Pathogens within the Microbiome of the Beef Production Chain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82; p. 2433–2443, 2016.

YOUSEFI, H.; YAHYAZADEH, A.; YAZDANBAKHSH, M.R.; RASSA, M.; MORADI-E-RUFCHAH E.O. Synthesis, spectral features and biological activity of some novel hetarylazo dyes derived from 6-amino-1,3-dimethyluracil. **Journal of Molecular Structure**, v. 1015, p. 27–32, 2012.

YOUSSEF, M. K.; BARBUT, S. Fat reduction in comminuted meat products – effects of beef fat, regular and pre-emulsified canola oil. **Meat Science**, v.87, n.4, p. 356-360, 2011.

YUNES, J.F.F. Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela. 2010. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

ZHANG, Q. Q.; YE, K. P.; JUNEJA, V. K.; XU, X. Response surface model for the reduction of *Salmonella* biofilm on stainless steel with lactic acid, ethanol, and chlorine as controlling factors. **Journal of Food Safety**, v. 37, p. 1-7, 2017.

ZHU, L.; FENG, X.; ZHANG, L.; ZHU, R.; LUO, X. Prevalence and Serotypes of *Listeria monocytogenes* Contamination in Chinese Beef Processing Plants. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 6, p. 556-560, 2012.

## CAPÍTULO 1:

### Artigo submetido ao periódico: *Foodborne Pathogens and Disease*

#### Atividade antimicrobiana de azo compostos frente a bactérias isoladas de carne caprina e ovina

Na elaboração dos derivados cárneos são utilizados sais de nitrito como conservantes, porém estudos apontam relação desses sais com efeitos tóxicos ao consumidor e doenças cancerígenas. Buscando estudar novos compostos que apresentem efeito conservante e auxiliem na redução da concentração dos sais de nitrito, ou até na sua substituição, foram realizadas pesquisas com 4 azo compostos (A1, A2, A3, A4) que nunca foram estudados sobre seu efeito antimicrobiano e/ou para uso em alimentos. Para tal, foram realizadas pesquisas para isolamento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. de carne caprina e ovina e avaliada a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos compostos frente aos microrganismos isolados, bem como o efeito sinérgico do azo composto com melhor atividade antimicrobiana com nitrito de sódio. Nesse estudo também foi realizado o teste de toxicidade com *Artemia salina* e o composto com melhor atividade submetido ao *docking molecular* com as enzimas DNA gyrase, MurD ligase e FtsA. Das 21 amostras coletadas, 15 estavam contaminadas com *S. aureus* (75%) e 13 com *E. coli* (62%), não houve isolamento de *Salmonella* spp. O melhor resultado apresentado foi da molécula A4, com potencial bactericida frente aos isolados de *S. aureus* em concentrações média de 230 µg/mL. Nos testes de produção de biofilme os 15 (100%) isolados de *S. aureus* apresentaram capacidade de produção de biofilme, sendo oito (61,5%) forte produtores e sete (38,5%) fraco produtores, oito (61,5%) isolados de *E. coli* foram fraco produtores. A4 foi capaz de interferir na formação do biofilme em oito *S. aureus* forte produtores, 100% dos isolados testados, e interferiu no biofilme consolidado em 50% dos isolados. O nitrito de sódio apresentou concentração bactericida mínima numa média de 67 µg/mL. No teste de sinergismo, nove (60%) *S. aureus* apresentaram redução de CBM em ação sinérgica de A4 com nitrito de sódio. O nitrito de sódio apresentou menores taxas de mortalidade para a toxicidade em *Artemia salina*, com 0% de mortalidade em concentração de 1.000 µg/mL e para A4 obtivemos mortalidade de 96% na concentração de 10 µg/mL e 100% nas concentrações superiores. O composto apresentou maior afinidade com a enzima FtsA, indicando que esse pode ser o fator relacionado a inibição de *S. aureus* pelo composto. Assim, o composto A4 apresentou resultados positivos para inibição de *S. aureus* na indústria de alimentos, microrganismos de grande importância relacionado a contaminação via manipulação inadequada, porém os resultados dos testes de toxicidade podem ser um fator que interfira na sua utilização em alimentos, dessa forma estudos com animais superiores devem ser realizados, para avaliar seu real efeito em mamíferos. Bem como estudos com adição em derivados cárneos para avaliar a vida de prateleira do produto.

**Palavras-chave:** antimicrobiano, azo composto, biofilme, produtos cárneos, sinergismo.

## Introdução

O acesso a alimentos adequados em quantidade e qualidade está diretamente relacionado à boa saúde de uma população (Saccol *et al.*, 2016). Os países em desenvolvimento, além de enfrentarem a problemática da fome associada ao aumento de suas populações, são prejudicados pelo risco de consumo de alimentos com altos índices de contaminação por microrganismos patogênicos (Paudyal *et al.*, 2017).

Atualmente, existe uma grande quantidade de produtos cárneos prontos para consumo que são manipulados repetidamente, tanto na obtenção da matéria-prima como no processamento dos derivados, favorecendo a contaminação (Ristori *et al.*, 2017). Esses hábitos no processamento são comumente associados aos surtos ocasionados por *S. aureus* (Bennett *et al.*, 2013) e outros patógenos de origem alimentar, como a *E. coli*, que além de apresentar elevada patogenicidade, causa preocupação pela sua capacidade de produção de biofilme, por estar envolvido com a resistência a antimicrobianos e sanitizantes, trazendo sérios impactos a qualidade microbiológica dos alimentos e a saúde do consumidor (Kim *et al.*, 2018).

Os sais de nitrito desempenham um papel importante na elaboração de produtos curados, fornecendo propriedades sensoriais específicas. Porém, o mesmo tem sido associado a formação de compostos N-nitrosos, que possuem sua relação a efeitos carcinogênico, mutagênico e teratogênico bem descritos (Majou e Christieans, 2018; Mirvish *et al.*, 1972). As nitrosaminas formadas são uma das preocupações mais atuais relacionadas ao consumo de produtos cárneos.

Dessa forma, estudos com novos conservantes para uso em produtos cárneos tem se tornado uma das principais vertentes na área. Os azo compostos vêm sendo descritos com potencial ação antimicrobiana, tanto na área médica, como também no setor de alimentos (Deb *et al.*, 2018; Mkpennie *et al.*, 2008). São compostos aromáticos caracterizados por uma ou mais ligações azo (R1 – NN – R2) e amplamente utilizados como corante de alimentos (Lang *et al.*, 2014). Concilio *et al.* (2017) propõem o seu uso para embalagens de alimentos.

Considerando as potencialidades dos azos compostos como antimicrobianos e com o intuito de propor uma nova utilidade para uma classe de compostos já explorada como corante em alimentos, bem como apontar para uma alternativa na conservação de produtos cárneos, foram avaliadas a atividade antimicrobiana de quatro azo compostos frente a bactérias isoladas de carne de caprinos e ovinos.

## Material e métodos

### *Isolamento Bacteriano*

Foram coletadas 21 amostras de carne caprina e ovina aleatoriamente em mercado público na região do Semiárido do Nordeste do Brasil. Foi realizada uma amostragem não probabilística por conveniência, em locais com as seguintes coordenadas geográficas: mercado 1 (S 09°22'50.4" W 040°32'02.2") e mercado 2 (S09°23'02.5" W 040°29'37.9"). Os pontos de coleta foram selecionados aleatoriamente, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas para realização das análises.

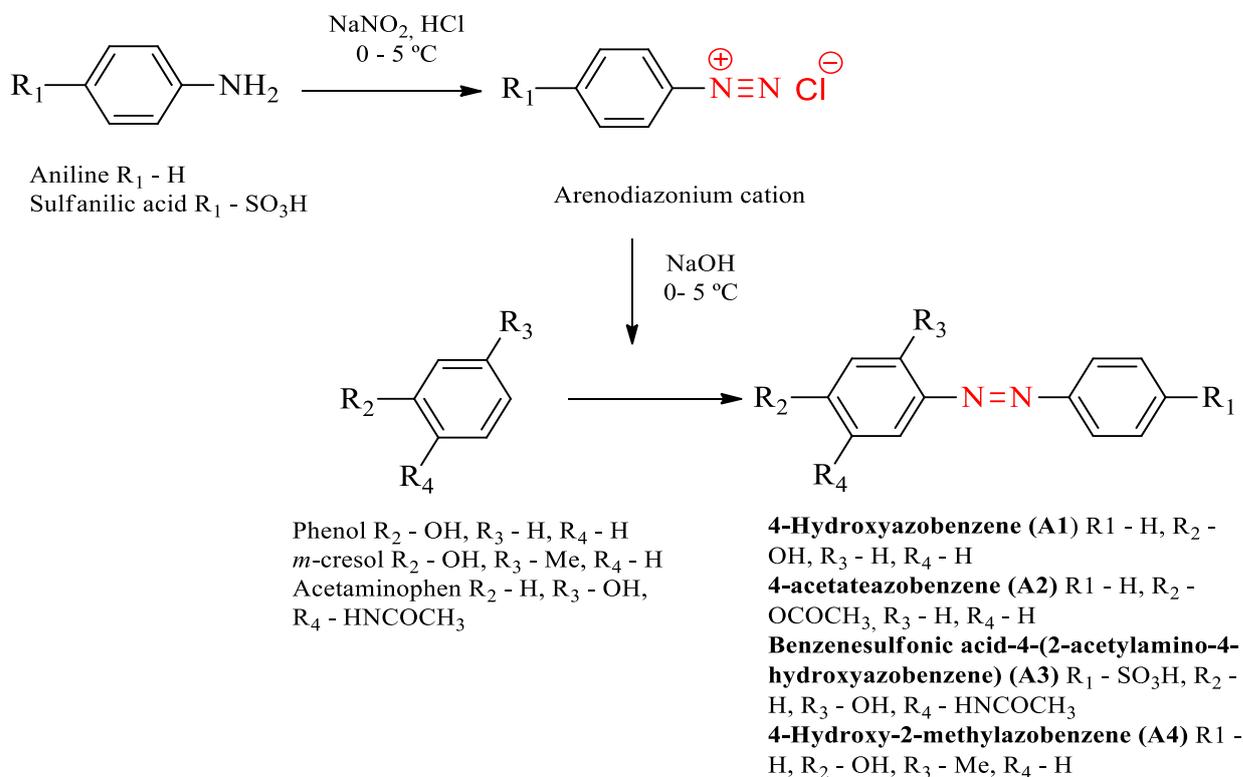
As pesquisas para enumeração de coliformes totais e termotolerantes, isolamento de *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* spp. foram realizadas utilizando meios de cultivo seletivos, e os microrganismos isolados identificados através de suas características morfológicas e bioquímicas de acordo com o Bacteriological Analytical Manual (BAM) (FDA, 2016). Posteriormente os microrganismos foram cadastrados sob o número A3AF952 no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). Foram utilizadas as ATCCs de *S. aureus* (25923) e *E. coli* (35218) como controle dos testes.

### *Síntese dos azo compostos*

Em um balão de reação foi pesado a amina aromática apropriada (0,006 mol de anilina ou ácido sulfanílico), posteriormente 6,0 mol L<sup>-1</sup> de solução aquosa de HCl foi adicionada, com 3 mL de 2,0 mol L<sup>-1</sup> de NaNO<sub>2</sub> a temperatura controlada entre 0 e 5 °C. A mistura permaneceu sob agitação por aproximadamente 30 minutos, passado esse tempo, a mistura reacional foi gotejada lentamente em uma solução do composto fenólico adequado 1,0 mol L<sup>-1</sup> (fenol, m-cresol ou paracetamol) em meio básico (NaOH 10%) e temperatura controlada entre 0 e 5 °C. A reação ficou por aproximadamente 40 minutos sob agitação e ocorreu a formação de um precipitado de coloração laranja-avermelhada, este foi filtrado a vácuo e deixado secar a temperatura ambiente (Guimarães *et al.*, 2016). Foi obtido com 60-75% de rendimento, O acetatezobenzene (A2) foi preparado a partir da acetilação de A1 empregando anidrido acético.

Os azo compostos foram sintetizados a partir de uma reação de acoplamento diazo entre um cátion arenodiazônio com um anel aromático ativado adequado. Inicialmente foi preparado

o cátion arenodiazônio a partir de uma reação de diazotação entre uma amina aromática e um agente nitrosante, neste caso o NaNO<sub>2</sub> (ARAÚJO et al., 2015) (figura 1).



**Figura 1.** Esquema de reação do acoplamento dos azo compostos

#### *Avaliação da atividade antimicrobiana*

A concentração bactericida mínima (CBM) e Concentração Inibitória Mínima (CIM), foram realizadas de acordo com o protocolo M07-Ed11 (CLSI, 2018). Distribuiu-se 200 µL de caldo Mueller Hinton (MH) em todos os 96 poços das microplacas de fundo chato. Posteriormente, 200 µL dos inibidores em estudo foram distribuídos em triplicata. Em seguida foi realizada uma diluição seriada obtendo as concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 e 7,8 µg/mL. Os isolados cultivados em BHI foram turvados em solução salina a 0,5 na escala de McFarland e a absorbância lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 625nm. Dessa suspensão, uma alíquota de 100 µL foi transferida para tubos contendo 9,9 mL de caldo MH, e em seguida, 20 µL da solução bacteriana foi inoculada em triplicata nos poços da microplaca, contendo as moléculas testadas.

Para o controle negativo, foi utilizado o caldo MH estéril e como controle positivo para cada isolado, foi utilizado caldo MH juntamente com o inóculo bacteriano testado. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, alíquotas de 10 µL, de

cada poço da microplaca, foram inoculadas em placas contendo ágar MH com posterior incubação a 37 °C durante 24 horas. Tal procedimento foi feito com o auxílio de um replicador estéril. A CBM foi determinada a partir da leitura visual, considerando a menor concentração da substância capaz de matar a bactéria. Para o teste de determinação da CIM, foram adicionados 20 µL de Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT, Neon, São Paulo, Brasil) diluído a 1% em cada poço da microplaca incubada a 37 °C por 1 hora. A mudança de coloração para a tonalidade avermelhada foi considerada como indicativa de viabilidade bacteriana.

Inicialmente foi realizada uma triagem com as ATCC's de *S. aureus* (25923) e *E. coli* (35218), a partir dos resultados que apresentaram atividade antimicrobiana deu-se continuidade com os isolados de carne.

### *Quantificação do biofilme*

Para a análise quantitativa da produção fenotípica de biofilme, foi utilizado o teste com violeta de genciana (adaptado de Merino *et al.*, 2009). Inicialmente, uma suspensão bacteriana foi realizada em tubos contendo 3 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) estéril (acrescidos de 0,25% de glicose quando utilizado *S. aureus*), estes foram incubados em estufa a 37°C por 24 h. Após este período, 5 µL desta suspensão foram adicionados aos poços das microplacas contendo 195 µL de TSB (acrescidos de 0,25% de glicose quando utilizado *S. aureus*), em seguida, as microplacas foram incubadas por 24 h a 37°C em aerobiose. Após este período, as microplacas foram lavadas três vezes com 200 µL de água destilada estéril, coradas com 100 µL de violeta de genciana 0,25% durante três minutos em temperatura ambiente e novamente lavadas três vezes com 200 µL de água destilada estéril. Posteriormente, o corante foi dissolvido em 200 µL de solução de álcool-acetona (80:20) e a densidade ótica (DO) foi medida no leitor de microplacas Easys® a 620 nm de comprimento de onda. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e ao final da leitura, foi realizada a média aritmética da triplicata para determinar a DO.

### *Atividade sobre a produção de biofilme*

Após realizar a quantificação do biofilme, avaliou-se a capacidade de interferência do azo composto sobre a formação de biofilme e o biofilme consolidado baseado na metodologia de Nostro *et al.* (2007).

Para avaliar a interferência no biofilme em formação os inóculos foram cultivados em tubos contendo 3 mL de TSB 0,25%, por 24 h a 37 °C. Após este tempo 100 µl deste cultivo foram acrescidos nos poços das microplacas contendo 100 µl do azo composto A4 (4-Hidroxi-2-metilazobenzeno) com equivalente ao valor de CBM observado na microdiluição em placa. Após 24 h de incubação a 37 °C, as microplacas foram lavadas com 200 µl de água destilada três vezes. Em seguida, os poços foram corados com 100 µl de violeta de genciana 0,25% por 3 minutos e novamente lavados três vezes com 200 µl de água destilada. Por fim, utilizou-se 200 µl de álcool-acetona (8:2) para fazer a análise da absorbância em leitor de microplaca modelo EXPERT PLUS-UV e mensurada em 620 nm.

Para o biofilme consolidado, 100 µL do inóculo bacteriano foram incubados em microplacas por 24h a 37°C para formação prévia do biofilme, sendo feita a lavagem com 200 µl de água destilada estéril três vezes, a fim de retirar a população de células não aderidas. Em seguida foi adicionado 200 µL da substância em estudo, em concentração equivalente à metade do valor de CBM e realizadas leituras em 0 e 24h, o ensaio foi realizado em triplicata. Para interpretação dos resultados dividiu-se a DO 0h pela de 24h e o resultado foi multiplicado por 100 para verificação da porcentagem de interferência com o biofilme consolidado.

#### *Teste de sinergismo*

Foi realizado o teste de sinergismo para as 15 cepas de *S. aureus* isoladas. Inicialmente, realizou-se uma suspensão bacteriana padronizada a partir de uma cultura com 24 horas de incubação em meio MH, até atingir a turvação equivalente a escala 0,5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Após, 100 µL da solução salina foi transferido para 9,9 mL de MH caldo e uma alíquota de 10 µL desse caldo foi adicionado em todos os poços da microplaca. Na coluna nº 6 adicionou-se 100 µL do sal de nitrito, na concentração de 4X o valor da CBM, para realização da diluição seriada, transferindo sequencialmente 100µL do volume do poço, no sentido horizontal, até a coluna 1. Na linha “A” adicionou-se 100µL da solução correspondente ao azo composto A4 (4-Hidroxi-2-metilazobenzeno), na concentração de 2X o valor da CBM, e diluiu-se seriadamente, transferindo sequencialmente 100µL do volume do poço, no sentido vertical até a linha F. Nos poços H1, H2 e H3 foram adicionados apenas os 10µL da suspensão bacteriana, juntamente com 100 µL de meio MH e nos poços H4, H5 e H6 foram adicionados apenas 100 µL do meio MH, servindo como controle de esterilidade do processo. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

Em seguida, com auxílio de um replicador multicanal, o conteúdo de cada poço da microplaca foi carimbado em placas contendo ágar MH, incubando-as novamente por mais 24 horas a 37°C. A interpretação do efeito sinérgico de cada antimicrobiano e das combinações foi determinada pelo cálculo do Índice da Fração Inibitória (IFI), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{IFI do HMAB (azo)} = \frac{\text{CBM combinado}}{\text{CBM do azo sozinho}}$$

$$\text{IFI do nitrito de sódio (sal)} = \frac{\text{CBM combinado}}{\text{CBM do sal sozinho}}$$

$$\Sigma\text{IFI} = \text{IFI azo} + \text{IFI sal}$$

A soma dos IFIs foi utilizada para a classificação dos efeitos, de acordo com alguns critérios: Ação sinérgica ( $\text{IFI} \leq 0,5$ ); Aditiva ( $0,5 < \text{IFI} \leq 1$ ); Indiferente ( $1 < \text{IFI} < 2$ ); Antagônico ( $\text{IFI} \geq 2$ ) (LEE; JANG; CHA, 2012).

### *Docking Molecular*

Os complexos enzima-inibidor da DNA gyrase (DNAG - PDB ID 2XCR) (Bax et al. 2010), MurD Ligase (MurD - PDB ID 2Y1O) (Tomasic et al, 2012) e Proteína FtsA (PFtsA - PDB ID 3WQT) (Fujita et al., 2014) foram baixados do Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Estruturas alcalóides foram submetidas ao docking molecular utilizando o Molegro Virtual Docker, versão 6.0.1 (MVD). Todos os compostos de água foram eliminados da estrutura da enzima e as enzima e estruturas do composto foram preparadas usando as mesmas configurações de parâmetros padrão no mesmo pacote de software. O procedimento de acoplamento foi realizado usando uma GRID de 15 Å de raio e resolução de 0,30 para cobrir o local de ligação das estruturas de enzima. O modelo de encaixe foi usado para focar a pesquisa em poses similares às interações e conformação do ligante. O algoritmo de escore de MolDock foi usado como a função de escore (Thomsen et al., 2006). O local de ligação era o mesmo que o ligando presente no arquivo pdb. Para o DnaG, MurD e PFtsA, o ligando co-cristalizado foi utilizado para comparação.

### *Teste de toxicidade com Artemia salina*

Para avaliar a toxicidade do composto A4 (4-Hidroxi-2-metilazobenzeno) e do nitrito de sódio utilizou-se o teste de letalidade descrito por Meyer et al (1987), e adaptada por Moreira et al (2003), por meio da concentração letal média (DL<sub>50</sub>) como parâmetro de atividade biológica. Em um recipiente de vidro (270x95x120mm) foi adicionado 1,5 L de água destilada com sal marinho artificial em concentração de 48 g/L, o recipiente foi dividido em dois compartimentos com um isopor com furos de aproximadamente 2 mm, o menor compartimento (90x95x120mm) foi protegido de luz e adicionado 50 mg de cistos de *Artemia salina*. Após 30 h os ovos eclodiram e as larvas migraram para o compartimento maior (180x95x120mm) com iluminação artificial. Dez náuplios foram coletados com auxílio de pipetador e transferidos para tubos com 5 mL de solução salina marinha artificial e os compostos a serem avaliados em 4 concentrações, 1000, 100, 10 e 1 µg/mL. Após 24 h os náuplios foram contados para obtenção da DL<sub>50</sub> através da fórmula: %mortes=[(teste-controle)/controle]x100.

### *Análise estatística*

Os resultados obtidos no teste de concentração inibitória mínima foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A ausência de normalidade de dados foi confirmada, sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação das médias obtidas na CIM nos testes envolvendo os azocompostos frente as cepas de *E. coli* e *S. aureus*. As comparações foram realizadas pelo método de Dunn.

## **Resultados e Discussão**

### *Isolamento Bacteriano*

Foram identificados 15 isolados de *S. aureus* e 13 *E. coli*, não sendo observada a presença de *Salmonella* spp. (Tabela 1). Entre os anos 2007 e 2016 bactérias foram responsáveis por 90,5% dos surtos relatados no Brasil, sendo os agentes etiológicos mais frequentes pelas DTA's, como *Salmonella* spp., *E. coli* e *S. aureus* e a manipulação inadequada como a maior causa de veiculação desses microrganismos (Brasil, 2018). Nos Estados Unidos da América,

durante o ano de 2016, foram relatados 839 surtos de doenças transmitidas por alimentos, resultando em 14.259 doenças, 875 hospitalizações e 17 mortes (CDC, 2018).

Tabela 1 – Micro-organismos isolados de carne de pequenos ruminantes comercializada em mercado público na região do Semiárido do Nordeste do Brasil no período de março a junho/2017.

AMOSTRA	Enumeração de coliformes		Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> /g
	Coliformes totais NMP/g	Coliformes termotolerantes NMP/g	
01	> 1100	> 1100	*
02	> 1100	> 1100	*
03	> 1100	> 1100	*
04	> 210	< 3,0	*
05	> 1100	< 3,0	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
06	> 1100	75	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
07	> 1100	460	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
08	> 1100	< 3,0	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
09	> 1100	> 1100	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
10	> 1100	3,0	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
11	> 1100	210	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
12	> 1100	< 3,0	0
13	150	> 1100	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
14	> 1100	< 3,0	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
15	> 1100	> 1100	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
16	> 1100	> 1100	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
17	150	< 3,0	0
18	> 1100	> 1100	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
19	> 1100	> 1100	0
20	*	*	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC
21	*	*	> 2,5 x 10 <sup>5</sup> UFC

S/I – crescimento de micro-organismos sem características de *Salmonella* spp.

\* Análises não realizadas por indisponibilidade de material e/ou meios específicos de isolamento no momento das análises.

*S. aureus* são micro-organismos comumente envolvidos em relatos de intoxicações alimentares, principalmente por serem produtores de diversas enterotoxinas (Marques *et al.*, 2015; Kroning *et al.*, 2016). Podem ser provenientes de diversas fontes, como utensílios, mão de manipulador, ambiente, ou mesmo, de etapas anteriores a comercialização, devido a forma inadequada de armazenamento favorecido sua multiplicação, já que a contaminação de carne pode ocorrer em diversos pontos da cadeia de produção (Ristore *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018).

### Síntese dos Azo Compostos

Dentre os aditivos utilizados em alimentos, estão os azo compostos, eles são coloridos e em razão disto são utilizados principalmente como corantes orgânicos (Pérez-Díaz e McFeeters, 2009). Alguns estudos relatam sua relação com atividade fungicida e bactericida. O corante vermelho Prontosil rubrum deu origem à classe de antimicrobianos sintéticos do tipo sulfonamidas, este azo composto foi desenvolvido na década de 1930 por Gerhard Domagk na empresa Alemã Bayer (Williams *et al.*, 2012).

Os azo compostos sintetizados foram 4-Hidroxi azobenzeno (A1) derivado do fenol e anilina, 4-acetate azobenzeno (A2) derivado do fenol e anilina com posterior acetilação, ácido benzenosulfônico-4-(2-acetilamino-4-hidroxi azobenzeno) (A3) derivado do paracetamol e ácido sulfanílico e o 4-Hidroxi-2-metil azobenzeno (A4) derivado do m-cresol e anilina. As estruturas químicas dos compostos estão representadas na figura 2. Não existem relatos de estudos dessas substâncias para fins de conservação em produtos alimentícios, bem como poucos relatos quanto a sua atividade antimicrobiana.

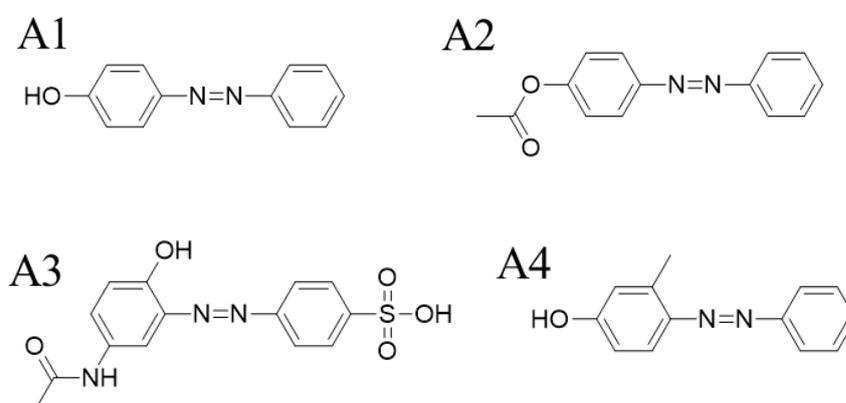


Figura 2 – Estrutura química dos azo compostos

### Avaliação da Atividade Antimicrobiana

O composto A1 apresentou ação bacteriostática e bactericida para *E. coli* em concentrações de 1000 µg/mL. Os demais compostos, não apresentaram atividade frente a *E. coli* nas concentrações testadas (Tabelas 2 e 3). Por outro lado, A4 (4-Hidroxi-2-metilazobenzeno) apresentou atividade bactericida frente aos isolados de *S. aureus* em concentrações que variaram entre 31,5 a 1000 µg/mL (Tabela 3). 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno (HMAB) apresenta a adição de um grupamento metil na posição 2 do anel benzeno, conferindo maior poder bactericida a essa molécula. Souza (2016) sugere que a presença de grupamento metil favorece a ação desse composto.

Tabela 2- Concentração inibitória mínima dos isolados frente aos azo compostos

Composto Azo-diaril	Atividade (%)	CIM	
		Faixa (µg/mL)	Media (µg/mL)
<i>E. coli</i>			
A1	100 (14/14)	500 – 1000	964
A2	**	**	**
A3	100 (14/14)	500 –1000	964
A4	**	**	**
<i>S. aureus</i>			
A1	**	**	**
A2	100 (16/16)	62,4 – 500	240
A3	**	**	**
A4	100 (16/16)	31,2 - 125	57,2

\*\* Teste não realizado, por não apresentar sensibilidade frente as ATCC's

Tabela 3- Concentração bactericida mínima dos isolados frente aos azo compostos

Composto Azo-diaril	Atividade (%)	CBM	
		Range (µg/mL)	Media (µg/mL)
<i>E. coli</i>			
A1	100 (14/14)	500 - 1000	964
A2	**	**	**
A3	43 (6/14)	1000 →1000	1000
A4	**	**	**
<i>S. aureus</i>			
A1	**	**	**
A2	69 (11/16)	62,4 →1000	854
A3	**	**	**
A4	93 (15/16)	31,2 – 1000	230

\*\* Teste não realizado, por não apresentar sensibilidade frente as ATCC's

O 4-Hidroxi-azobenzeno (A1) e o 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno (A4) apresentaram ação antifúngica frente a sete fungos de origem fitopatogênica (Xu e Zeng, 2010). Karabacak *et al.* (2015) avaliaram a atividade antibacteriana de 21 compostos contendo o grupo funcional azo, sendo que dez dos compostos avaliados apresentaram atividade antimicrobiana. Resultados preliminares de docking molecular indicaram que esses compostos podem inibir a ATP sintase bacteriana, enzima estudada no desenvolvimento de novas drogas com redução da resistência bacteriana (Boulet *et al.*, 2018, Piotto *et al.*, 2013). Sessa *et al.* (2016), também sintetizaram uma classe de compostos ativos com estrutura de azobenzeno e baixos valores de toxicidade *in silico* foram observados capacidade de inibição de biofilme de *S. aureus* e *C. albicans* e interferência na resistência antimicrobiana, estudos com aditivos alimentares com baixa toxicidade são uma das vertentes mais esperadas na indústria alimentícia.

Piotto *et al.* (2013) sintetizaram cinco derivados azobenzeno com baixos valores de toxicidade determinados por investigação computacional e identificou a sua a atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* e a capacidade de destruir biofilmes frente a *S. aureus* e *Cândida albicans*. Além de atividade antimicrobiana, essas moléculas apresentam estabilidade térmica para aplicação em matrizes de polímeros comerciais para produção de filmes de embalagens com efeito bactericida e antibiofilme (Sessa *et al.*, 2016). Essas características são requeridas para a utilização em alimentos, que passam por tratamentos térmicos e diferentes tipos de processamentos.

#### *Quantificação do Biofilme e interferência sobre a produção de biofilme*

Todos os isolados de *S. aureus* apresentaram capacidade de produção de biofilme, sendo oito (53%) forte produtores e sete (47%) fraco produtores. Nos testes para *E. coli*, 8 (61,5%) tiveram fraca capacidade e as demais não apresentaram capacidade de formação de biofilme.

Quanto a interferência no biofilme em formação, o azo composto A4 mostrou capacidade de interferir na formação em todos os isolados de *S. aureus* que apresentaram forte produção (tabela 4), e atividade antibiofilme sobre o biofilme já consolidado frente a quatro isolados (tabela 5).

Tabela 4 - Interferência do HMAB na formação de biofilme dos isolados de *S. aureus*.

Isolado	Classificação quanto a produção de biofilme	
	Classificação quanto a produção de biofilme	Classificação quanto a formação do biofilme na presença de A4
17	Forte	Moderado
19	Forte	Moderado
20	Forte	Fraco
21	Forte	Moderado
22	Forte	Moderado
23	Forte	Fraco
26	Forte	Fraco
28	Forte	Fraco
ATCC 25923	Forte	Fraco

Tabela 5 - Interferência do HMAB no biofilme consolidado dos isolados de *S. aureus*.

Isolado	Absorbância		
	DO 0h	DO 24h	Biofilme (%)
17	0,113	0,152	74,18
19	0,061	0,062	99,46
20	0,369	0,261	141,69*
21	0,089	0,078	113,19*
22	0,158	0,143	110,72*
23	0,056	0,047	119,29*
26	0,096	0,115	83,72
28	0,074	0,078	94,87
ATCC 25923	0,191	0,198	96,63

DO0h – Densidade Ótica média imediatamente após a adição do EEB; DO24h – Densidade Ótica média transcorridas 24h da adição do EEB; <100%: não interferiu no biofilme consolidado; >100%: interferiu no biofilme consolidado; =100%: permaneceu a mesma produção de biofilme.

\* Amostras que apresentaram interferência no biofilme consolidado.

A capacidade de formação de biofilme que os isolados de *S. aureus* apresentaram nesse estudo são uma das principais preocupações para a saúde pública, pois estão diretamente relacionada a resistência antimicrobiana e virulência multifatorial. Os microrganismos tendem a formar biofilme durante várias etapas do processamento de alimentos, bem como em superfícies de aço inoxidável e de poliestireno, dificultando sua inibição ou remoção (Kroning *et al.*, 2016; Vergara *et al.*, 2017; Miao *et al.*, 2017). Os biofilmes reduzem a eficácia dos sanitizantes, causam perdas econômicas à indústria, contaminam alimentos e podem aumentar o nível de resistência antimicrobiana (Simões *et al.*, 2010). O composto A4 apresentou capacidade de redução do biofilme em formação e do consolidado, mostrando que seu uso pode ser favorável tanto como aditivo alimentar, ou como sanitizante.

### *Teste de Sinergismo*

A CBM do nitrito de sódio apresentou média de 67 µg/mL e foi realizada para viabilizar o teste de sinergismo. Os compostos testados apresentaram sinergismo frente a 8 (57%) das 14 cepas (Tabela 6), apresentando uma redução média de 6 e 11% dos valores iniciais da concentração inibitória mínima do nitrito e azo composto respectivamente.

Muitos compostos sintéticos e naturais estão sendo pesquisados para utilização como conservantes em carnes, de forma isolada ou em combinação com os sais de nitrito, buscando principalmente a redução na concentração utilizada desses compostos. Vujadinović *et al.* (2017) identificaram que os óleos essenciais de oregano e canela apresentaram sinergismo com teores reduzidos de nitrito de sódio frente a patógenos de referência gram positivo e gram negativo. Stanojevic *et al.* (2010). Em contrapartida, Lim *et al.* (2016) isolaram *Clostridium difficile* em produtos cárneos processados e os testes de sinergismo com nitrito de sódio, nitrato de sódio e metabissulfito de sódio mostraram sobrevivência do patógeno em níveis maiores do que os permitidos pela legislação. Esses resultados demonstram a necessidade de estudos com novos agentes antimicrobianos e como a ação sinérgica de dois compostos quando se combinam podem exercer um efeito inibitório maior do que a soma de seus efeitos individuais (Shi *et al.*, 2016). Essa efeito foi observado no teste de sinergismo realizado no nosso estudo entre o azo composto A4 e o nitrito de sódio.

Tabela 6 – Efeito combinatório entre o HMAB e Nitrito de sódio 7%, frente a isolados de *S. aureus*.

Cepa bacteriana	Substância teste	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )		$\Sigma\text{FIC}$	Resultado
		Isolado	Combinado		
ATCC 25923	Azo composto	1000	250	0,281	Sinérgico
	Nitrito de sódio 7%	250	7,8		
17		500	250	0,531	Aditivo
		250	7,8		
18		31,2	31,2	2	Indiferente
		125	125		
19		250	7,8	0,093	Sinérgico
		31,2	1,95		
23		125	3,9	0,156	Sinérgico
		15,6	1,95		
24		250	15,6	0,312	Sinérgico
		7,8	1,95		
25		500	15,6	0,281	Sinérgico
		31,2	7,8		
26		500	500	1,25	Indiferente
		31,2	7,8		
27		500	31,2	0,187	Sinérgico
		62,5	7,8		
28		250	62,5	0,312	Sinérgico
		31,2	1,95		
30		31,2	0,975	0,156	Sinérgico
		15,6	1,95		

### *Docking molecular*

O composto HMAB foi acoplado à estrutura cristalina de três importantes enzimas envolvidas no mecanismo antimicrobiano. Os resultados estão resumidos na Tabela 4 e indicam que este composto apresenta mais afinidade com a enzima PFtsA, quando comparado com os ligantes originais. Esta sugestão é apoiada pela diferença entre a ligação da energia do HMAB e os ligantes enzimáticos especificados. Para PFtsA essa diferença foi inferior a 20%, enquanto para o DNAG e MurD foi superior a 30%.

Tabela 7 - Energias de ancoramento de MolDock para HMAB e ligantes originais em enzimas envolvidas no mecanismo antimicrobiano (DNA Gyrase – DNAG, MurD Ligase – MurD, Protein FtsA – PFtsA).

	DnaG	PFtsA	MurD
HMAB	-91.49	-104.95	-100,97
Ligante de referência	-133.50	-115.51	-181,10

A proteína FtsA se liga a FtsZ desempenhando papel fundamental na divisão celular, sendo altamente conservadas em muitas espécies bacterianas e tornando-as alvos atraentes para o desenvolvimento de agentes antibacterianos (Mura et al, 2016; Fujita et al, 2014). A FtsA também está presente no gênero *E. coli*, *Enterococcus faecalis* e outros microrganismos (Villanelo et al, 2011; Sharma e Khan, 2018), além de que, não possui similares significativos em humanos, sendo uma linha de pesquisa para desenvolvimento de produtos com baixa toxicidade (Ragunathan et al., 2018).

### *Efeito tóxico do HMAB e nitrito de sódio*

O HMAB apresentou letalidade de 96% na concentração de 10 µg/mL e 100% de morte acima dessa concentração. O nitrito de sódio apresentou um percentual de morte de 0% (tabela 5). O teste de toxicidade com *Artemia salina* é utilizado como uma alternativa aos testes que utilizam ratos e coelhos, porém, animais superiores têm demonstrados respostas diferentes com relação a toxicidade.

Tabela 8 – Percentual de morte no teste de toxicidade para *Artemia salina* com HMAB e nitrito de sódio.

Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )	Substância teste %	
	HMAB	Nitrito de sódio
1000	100	0
100	100	0
10	96	0
1	0	0
Controle	0	0

Ranjani et al. (2018) estudaram a toxicidade de nanopartículas de prata onde doses maiores que 50  $\mu\text{g}$  aumentaram a letalidade em *Artemia salina*, mas para camundongos não se observou efeito na função hepática e as reações renais e entéricas foram insignificantes, mostrando dessa forma que a toxicidade em *Artemia salina* nem sempre terá o mesmo efeito em animais superiores. Vários corantes sintéticos e naturais foram removidos das listas de permissões para utilização em alimentos por suas características mutagênicas ou carcinogênicas, e os permitidos estão inseridos com a ingestão diária aceitável (IDA) nos regulamentos nacionais e internacionais (Adegoke et al., 2014). Em estudos *in silico* Piotto et al. (2013) identificaram 22 moléculas com baixa toxicidade a partir de 6156 azo compostos, logo, estudos mais específicos sobre a toxicidade do HMAB são necessários para viabilizar a sua utilização na indústria de alimentos.

## Conclusões

O alto índice de contaminação da carne analisada neste estudo, demonstra que existe risco de surtos alimentares causados por *S. aureus* ou *E. coli*. A capacidade de produção de biofilme observada nas cepas, demonstra sua característica de maior resistência a agentes antimicrobianos. Assim, é fundamental aumentar a fiscalização em mercados públicos para evitar a comercialização de produtos cárneos de forma irregular.

Mesmo o azo composto 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno apresentando bons resultados relacionados a atividade antimicrobiana e antibiofilme frente a isolados de *S. aureus*, não se pode indicar o seu uso como conservantes de produtos cárneos, pois o mesmo não apresentou atividade satisfatória frente a isolados de *E. coli*, bem como não foi testado frente a outras cepas de importância para o setor de alimentos. Ainda, faz-se necessário a realização de testes que comprovem a manutenção de aspectos físicos, químicos e sensoriais da carne elaborada com o composto. Também é necessária a realização dos testes de *shelf life* para avaliar a eficácia do composto no alimento.

A capacidade que o 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno possui de ligação a FtsA, pode indicar que a atividade antimicrobiana pode ser via inibição de replicação do *S. aureus*. Quanto a toxicidade, os testes com *Artemia salina* podem dar um direcionamento da dose tóxica, mas os estudos em camundongos não devem ser dispensados, pois nesses organismos os parâmetros avaliados se aproximam mais das características fisiológicas humanas.

## Referências

Adegoke OA, Ghosh M, Manivannan J, Sinha S, Mukherjee A. Genotoxicity evaluation of 4-carboxyl-2,6-dinitrophenylazohydroxynaphthalenes in mice. *Toxicol Ind Health*. 2014; 30(5), 394-404.

Araújo CRM, Leite-Filho CA, Santos VLA, Maia GLA, Gonsalves AA. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. *Quim. Nova* 2015; 38:868-873.

Bax BD, Chan PF, Eggleston DS, Fosberry A, Gentry DR, Gorrec F, Giordano I, Hann MM, Hennessy A, Hibbs M, Huang J, Jones E, Jones J, Brown KK, Lewis CJ, May EW, Saunders MR, Singh O, Spitzfaden C, Shen C, Shillings A, Theobald AF, Wohlkonig A, Pearson ND, Gwynn MN. Type Iia Topoisomerase Inhibition by a New Class of Antibacterial Agents. *Nature*. 2010; 466: 935.

Bennett SD, Walsh KA, Gould LH. Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clin Infect Dis* 2013; 57:425-433.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. Informações Técnicas. 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos/informacoes-tecnicas> Acesso: Outubro 25, 2018. (In Portuguese).

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2016, Annual Report. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2018.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11th ed. CLSI Standard M07. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

Deb T, Ganguly D, Sen S, Giri P, Dhar P, Das S. Modification of the toxicity of an azo compound through complex formation help target bacterial strains. *J Chem Sci* 2018; 94:1-9.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. BAM-Bacteriological Analytical Manual. Capítulos 1, 4, 5 e 12. Disponível em: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm> Acesso: 24 de junho de 2016 (Online).

Fujita J, Maeda Y, Nagao C, Tsuchiya Y, Miyazaki Y, Hirose M, Mizohata E, Matsumoto Y, Inoue T, Mizuguchi K, Matsumura H. Crystal structure of FtsA from *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett*. 2014; 588:1879-1885.

Gould GW. Introduction. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Applied Science, London, 1989; 1–42

Guimarães DG, Gonsalves, de Assis A, Araújo CRM. Síntese do 4-((5-acetamido-2-hidroxifenil) diazenil) benzenossulfônico, um Azobenzeno Derivado do Acetaminofeno, e Avaliação do seu Potencial como Indicador de Valor de pH. *Rev. Virtual Quim* 2016; 8:1461-1475.

Hecke TV, Vossen E, Hemeryck LY, Bussche JV, Vanhaecke L, De Smet S. Increased oxidative and nitrosative reactions during digestion could contribute to the association between well-done red meat consumption and colorectal cancer. *Food Chem* 2015; 187:29-36.

Jun Kobayashi MD. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of *N*-nitroso compounds: A review. *Nitric Oxide* 2018; 73:66-73.

Karabacak Ç, Tilki T, Tuncer BO, Cengiz M. Antimicrobial pyrazole dyes: synthesis, characterization, and absorption characteristics. *Res Chem Intermed* 2015; 41:1985–1999.

Kim HJ, Oh T, Baek SY. Multidrug Resistance, Biofilm Formation, and Virulence of *Escherichia coli* Isolates from Commercial Meat and Vegetable Products. *Foodborne Pathog Dis* 2018;*in press*.

Kroning IS, Iglesias MA, Sehn CP, Gandra TKV, Mata MM, Padilha da Silva W. *Staphylococcus aureus* isolated from handmade sweets: Biofilm formation, enterotoxigenicity and antimicrobial resistance. *Food Microbiol* 2016; 58:105-111.

Lorenzo JM, Sarriés MV, Tateo A, Polidori P, Franco D, Lanza M. Carcass characteristics, meat quality and nutritional value of horsemeat: A review. *Meat Sci* 2014; 96:1478–1488.

Majou D, Christieans S. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Sci* 2018; 145:273-284.

Marques JL, Volção LM, Funk GD, Kroning IS, Silva WP, Fiorentini AM, Ribeiro GA. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. *Ind Crops Prod* 2015; 77:445-450.

Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penadés JR, Lasa I. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2009; 191:832-843.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnan JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *J Med Plant Res* 1982; 45(1), 31-34.

Miao J, Liang Y, Chen L, Wang W, Wang J, Li B, Li L, Chen D, Xu Z. Formation and development of *Staphylococcus* biofilm: With focus on food safety. *J Food Saf* 2017; 37:1-11.

Mirvish SS, Wallcave L, Eagen M, Shubik P. Ascorbate-Nitrite Reaction: Possible Means of Blocking the Formation of Carcinogenic N-Nitroso Compounds. *Science* 1972; 177:65-68.

Mkpenie V, Ebong G, Obot IB, Abasiokong B. Evaluation of the effect of azo group on the biological activity of 1-(4-methylphenylazo)-2-naphthol. *E-J. Chem* 2008; 5:431-434.

Moreira, F.P.M., Coutinho, V., Montanher, A.B.P., Caro, M.S.B., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. Quim Nova 2003; 26(3), 309-311.

Mura A, Fadda D, Perez AJ, Danforth ML, Musu D, Rico AI, Krupka M, Denapaite D, Tsui HT, Winkler ME, Branny P, Vicente M, Margolin W, Massidda O. Roles of the Essential Protein FtsA in Cell Growth and Division in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 2017; 199(3) e00608-16.

Paudyal N, Anihouvi V, Hounhouigan J, Matsheka MI, Sekwati-Monang B, Amoa-Awua W, Atter A, Ackah NB, Mbugua S, Asagbra A, Abdelgadir W, Nakavuma J, Jakobsen M, Fang W. Prevalence of foodborne pathogens in food from selected African countries – A meta-analysis. Int J Food Microbiol 2017; 249:35-43.

Pérez-Díaz IM, McFeeters RF. Modification of azo dyes by lactic acid bacteria. J Appl Microbiol, 2009; 107:584-589.

Piotto S, Concilio S, Sessa L, Porta A, Calabrese EC, Zanfardino A, Varcamonti M, Iannelli P. Small azobenzene derivatives active against bacteria and fungi. Eur J Med Chem, 2013; 68:178-184.

Ragunathan A, Malathi K, Ramaiah S, Anbarasu A. FtsA as a cidal target for *Staphylococcus aureus*: Molecular docking and dynamics studies. J Cell Biochem 2018; 120(5), 1-8.

Ranjani A, Gopinath PM, Ananth S, Narchonai G, Santhanam P, Thajuddin N, Dhanasekaran D. Multidimensional dose-response toxicity exploration of silver nanoparticles from *Nocardiopsis flavascens* RD30. Appl Nanosci 2018; 8(4), 699-713.

Ristore CA, Rowlands REG, Martins CG, Barbosa ML, Santos LF, Jakabi M, Franco BDGM. Assessment of Consumer Exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Meat Products at Retail in the City of Sao Paulo, Brazil. Foodborne Pathog Dis 2017; 14:447-453.

Saccol ALF, Serafim AL, Hecktheuer LH, Medeiros LB, Silva Júnior EA. Food Safety in Feeding Services: A Requirement in Brazil. Crit Rev Food Sci Nutr 2016; 56:1363-1370.

Schirmer BC, Langsrud S. Evaluation of Natural Antimicrobials on Typical Meat Spoilage Bacteria *In Vitro* and in Vacuum-Packed Pork Meat. J Food Sci 2010; 75;2.

Sessa L, Concilio S, Iannelli P, De Santis F, Porta A, Piotto S. Antimicrobial azobenzene compounds and their potential use in biomaterials. (APMAS'15): Proceedings of the 5th International Advances in Applied Physics and Materials Science Congress & Exhibition, Oludeniz, Turkey (16–19 April 2015): AIP Conference Proceedings 2016; 1727:1-12.

Sharma D, Khan AU. Role of cell division protein divIVA in *Enterococcus faecalis* pathogenesis, biofilm and drug resistance: A future perspective by in silico approaches. Microb Pathog 2018; 125, 361-365.

Souza MIF. Avaliação das atividades biológicas de novos derivados da nitrofurantoína como potenciais candidatos a fármacos. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/26897> Acesso em: 16/07/2019.

Strijbos C, Schluck M, Bisschop J, Bui T, de Jong I, van Leeuwen M, von Tottleben M, van Breda SG. Consumer awareness and credibility factors of health claims on innovative meat products in a cross-sectional population study in the Netherlands. *Food Qual Prefer* 2016; 54:13-22.

Thomsen R, Christensen MH. Moldock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 2006; 49(11), 3315-3321.

Tomasic T, Sink R, Zidar N, Fic A, Contreras-Martel C, Dessen A, Patin D, Blanot D, Muller-Premru M, Gobec S, Zega A, Kikelj D, Masic LP. Dual Inhibitor of MurD and MurE Ligases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *ACS Med Chem Lett* 2012; 3, 626-630.

Vergara A, Normano G, Di Ciccio P, Pedonese F, Nuvoloni R, Parisi A, Santagada G, Colagiorgi A, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. Biofilm Formation and Its Relationship with the Molecular Characteristics of Food-Related Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Food Sci* 2017; 82:2364-2370.

Villanelo F, Ordenes A, Brunet J, Lagos R, Monasterio O. A model for the *Escherichia coli* FtsB/FtsL/FtsQ cell division complex. *BMC Structural Biology* 2011; 11, 28.

Wang H, Wang H, Liang L, Xu X, Zhou G. Prevalence, genetic characterization and biofilm formation *in vitro* of *Staphylococcus aureus* isolated from raw chicken meat at retail level in Nanjing, China. *Food Control* 2018; 86:11-18.

WHO. World Health Organization. The top 10 causes of death. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> 24/maio/2018. Acesso: 10 de novembro de 2018.

Williams DA, Foye WO, Lemke TL. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 7nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2012, cap. 38.

Xu H, Zeng X. Synthesis of diaryl-azo derivatives as potential antifungal agentes. *Bioorganic Med Chem Lett* 2010; 20:4193-4195.

## Capítulo 2

Artigo submetido ao periódico: **International Journal of Food Microbiology**

### *Efeito antimicrobiano de azo composto em linguiça de cordeiro contaminada com *Staphylococcus aureus*: shelf-life e atributos de qualidade*

#### Resumo

O efeito tóxico dos conservantes utilizados em produtos cárneos vem abrindo espaço para pesquisas com compostos alternativos que apresentem redução dos mesmos e não tenham efeito nocivo sobre a saúde dos consumidores. Nesse estudo, foi realizada a avaliação da vida de prateleira de linguiça de cordeiro com adição de um azo composto (4-Hidroxi-2-metilazobenzeno) que apresenta atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Foram realizados tratamentos com o produto teste, com o nitrito de sódio e um grupo controle, sem adição de conservante. Os testes de umidade e pH demonstraram que os tratamentos não apresentaram diferenças, porém a colorimetria do tratamento com 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno apresentou resultados superiores, indicando uma boa característica para o produto. Na contagem de microrganismos mesófilos aeróbicos, microrganismos psicrófilos e *S. aureus*, o composto teste apresentou contagens menores que o grupo controle, já para enumeração de coliformes o 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno não apresentou atividade antimicrobiana. Porém, quando comparado aos resultados com o nitrito de sódio, o 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno apresentou contagens superiores. Nesse experimento não houve isolamento de *Salmonella* spp. em nenhum tratamento. Dessa forma, o estudo demonstrou que o azo composto tem efeito antimicrobiano, porém, não apresentou capacidade para substituição do nitrito de sódio, seriam necessários outros testes que avaliassem se a redução na concentração dos dois compostos em efeito sinérgico viabilizariam o seu uso.

Palavras-chave: aditivos alimentares, atributos de qualidade, conservação.

## 1. Introdução

Em todo o mundo, a segurança microbiana dos alimentos continua sendo uma grande preocupação para todos os segmentos do setor, incluindo os consumidores, agências reguladoras e indústrias. Muitas estratégias de conservação têm sido usadas tradicionalmente para o controle de deterioração microbiana, mas a contaminação de alimentos e deterioração por micro-organismos ainda constitui um problema que precisa ser adequadamente controlado (Negi, 2012).

Dentre os conservantes empregados na conservação de produtos cárneos, estão os sais de nitrito, que fornecem propriedades sensoriais específicas, estabilidade e segurança do produto, sendo reconhecido por sua ação bacteriostática e bactericida. No entanto, tem-se observado relatos que o associação a formação de compostos N-nitrosos, e esses possuem uma relação com efeitos carcinogênico, mutagênico e teratogênico bem descritos (Ruiz-Capilas et al., 2014; Majou e Christieans, 2018).

Outro grupo de aditivo alimentares que está relacionando a melhoria da aparência são os corantes, a determinação da coloração de um corante depende da sua estrutura química, na qual a distribuição eletrônica entre os grupos funcionais e cadeia de átomos determina a emissão de uma determinada faixa de cor proveniente da reflexão da radiação visível (Martínez Suárez, 2017; Leal, 2011). Dentre os corantes sintéticos utilizados em alimentos, destaca-se a classe azo, o maior grupo de aditivos dessa categoria, representando 70% dos pigmentos produzidos no mundo. São classificados e conhecidos pela presença de uma dupla ligação entre nitrogênios no meio da molécula (-N=N-) (Garcia-Segura et al., 2013).

Considerando a facilidade de produção, o baixo custo, a excelência na coloração dos alimentos, a neutralidade de sabor e a necessidade de pouca quantidade combinada com a boa solubilidade, o uso dos corantes azo determinou uma boa vantagem econômica e o interesse por eles cresceu bastante no século XX (Downham; Collins, 2000). Além da sua característica de corante, alguns autores vêm discutindo a sua eficácia quanto a atividade antimicrobiana (Valerine et al, 2018; Karabacak et al, 2015).

Assim, novos estudos relacionados a descoberta de potenciais conservantes para uso em produtos cárneos são relevantes. Considerando as potencialidades dos azo compostos como antimicrobianos (Deb et al., 2018; Mkpennie et al., 2008), e com o intuito de propor uma nova utilidade para uma classe de compostos já explorada como corante, bem como, apontar para uma alternativa na conservação de produtos cárneos, foi avaliada a vida de prateleira da linguiça

elaborada com o 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno (HMAB), composto sem relato do uso em alimentos, bem como inexistentes estudos com atividade antimicrobiana em microrganismos de origem alimentar.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1 Carne de cordeiro*

A carne de cordeiro foi obtida de abatedouro municipal e transportada sob refrigeração até o Laboratório de Tecnologia de Carnes do Instituto Federal do Sertão Pernambucano. Foram utilizados quatro pernis, provenientes de dois animais, com conservação em câmara frigorífica a 4°C por 24h.

### *2.2 Elaboração das linguiças*

O HMAB foi cedido pelo laboratório de Bioquímica da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Para elaboração das linguiças, utilizou-se uma concentração quatro vezes o valor da média da concentração bactericida mínima obtida nos testes de microdiluição em Caldo frente a *S. aureus* isolados de carne ovina.

Foi feita a desossa manual, retirando-se cartilagens, tendões e gorduras aparentes, a mesma foi picada e moída em equipamento de moagem com disco de diâmetro de 8mm. O equipamento e todos utensílios utilizados foram previamente higienizados e fervidos por 30 minutos.

Após a moagem, a carne foi dividida em porções e tratada em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta por 30 minutos, seguindo para elaboração dos diferentes tratamentos.

Cada uma das três porções foi dividida em duas partes, obtendo-se um total de seis tratamentos A, B, C, D, E e F (Tabela 1) e embutidos em envoltório de carneiro salgado, tratados em água corrente para retirada do excesso de sal. Na primeira porção (controle) não foi adicionado nenhum aditivo, na segunda porção foi adicionado 0,3% de sal de cura R/S (nitrito de sódio 7%) a cada 1kg de carne e na terceira porção foi adicionado 0,2% do azo composto HMAB para cada 1 kg de carne. Para melhorar a solubilidade do HMAB, o mesmo foi diluído em 10 mL óleo de soja para adição na formulação. A mesma quantidade de óleo foi adicionada aos outros tratamentos.

Tabela 1 – Tratamentos realizados nas linguças de carne de cordeiro.

Amostra	Tratamento
A	Sem conservantes e sem contaminação experimental
B	Com sal de nitrito e sem contaminação experimental
C	Com azo composto e sem contaminação experimental
D	Sem conservante e com contaminação experimental com <i>S. aureus</i>
E	Com sal de nitrito e com contaminação experimental com <i>S. aureus</i>
F	Com azo composto e com contaminação experimental com <i>S. aureus</i>

### 2.3 Contaminação das linguças

Os tratamentos D, E e F foram contaminados com uma cepa de *S. aureus* isolada de carne ovina e identificadas por provas bioquímicas e moleculares, caracterizada como forte produtora de biofilme. Nos testes de atividade antimicrobiana com o HMAB, obteve-se uma CBM de 500 µg/mL e 31,2 µg/mL para o sal de nitrito.

A cepa foi inoculada em ágar BHI a 37 °C/24h em aerobiose, posteriormente quatro a cinco colônias foram inoculadas em solução salina a 85% e submetidas a turvação (DO 625nm). Foi feita diluição seriada e utilizada a diluição 10<sup>-4</sup> com contagem equivalente a 1,8 x 10<sup>7</sup> UFC. Para contaminação, as linguças foram imersas em solução contendo o inóculo por cinco minutos. Em seguida, as porções de aproximadamente 100 g foram embaladas assepticamente em sacos plásticos estéreis devidamente identificados e armazenados em temperaturas de 4 a 7 °C.

### 2.4 Análise físico-química

Os valores de umidade foram obtidos nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15 de estocagem e realizados em duplicata. Para determinação de umidade 5g da amostra foi pesada em cadinho de porcelana previamente tarado, aquecido e resfriado em dessecador, após a amostra foi levada a estufa a temperatura de 105 °C/24h e feita a pesagem após resfriamento em dessecador. O pH foi aferido nos dias 0, 3, 9, 15, seguindo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). Para obtenção desta variável, cinco gramas da amostra foram homogeneizadas em 50 mL de água destilada e feita a leitura após calibração.

A análise de cor foi realizada em tempo diferente as demais análises, com repetição dos tratamentos A, B e C, medindo-se L\* (luminosidade) a\* (variação do vermelho ao verde) e b\*(variação do amarelo ao azul) com colorímetro, modelo MiniScan EZ. Os valores foram lidos através do Software Instruments Diagnostics versão 1.11.131. A diferença das cores ΔE foi

determinada por meio da equação:  $\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ . Para cada tratamento, o valor médio de três pontos diferentes de leitura foi obtido.

### 2.5 Análises microbiológicas

As análises foram realizadas nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15, seguindo a metodologia recomendada pelo American Public Health Association (APHA, 2015). Pesou-se 10 g linguiça de cada tratamento para homogeneização 90 mL de água peptonada tamponada, seguindo com as diluições seriadas de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Foram realizadas análises para contagem de microrganismos mesófilos aeróbicos, microrganismos psicotróficos, em Ágar Contagem Padrão (PCA), pelos métodos de plaqueamento em profundidade e superfície, respectivamente, além da enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes por meio da metodologia do Número Mais Provável (NMP) e isolamento de *Salmonella* spp. e contagem de *S. aureus*. Na pesquisa de microrganismos psicotróficos, as análises foram realizadas nos dias 0, 6 e 12.

### 2.6 Análise estatística dos dados

Para os resultados obtidos nas análises microbiológicas, especificamente na contagem de microrganismos mesofílicos e psicotróficos, foi realizada uma análise estatística inferencial, sendo os valores obtidos para a UFC/mL submetidos à transformação logarítmica. Depois, o teste de Friedman em dois sentidos foi empregado. Para a análise dos resultados entre os tratamentos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Para as demais variáveis microbiológicas e físico-químicas, a análise estatística descritiva foi realizada com a determinação dos valores absolutos e relativos.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Análise físico-química

Os valores de umidade variaram entre 66 e 71% nos tratamentos sem contaminação (fig. 1a) e entre 68 e 72% (fig. 1b) nos tratamentos com contaminação experimental. Esses valores estão previstos em documentos que normatizam esta variável (BRASIL, 2000). Os resultados de pH variaram entre 5,4 e 6,0, com aumento no dia 15 para os tratamentos A e D (fig 1c e 1d). A presença de microrganismos psicotróficos pode elevar o pH do produto durante o

armazenamento, devido a produção de protease. O consumo de aminoácidos leva à elevação do pH devido à formação de amônia e aminas (Scapin et al., 2015).

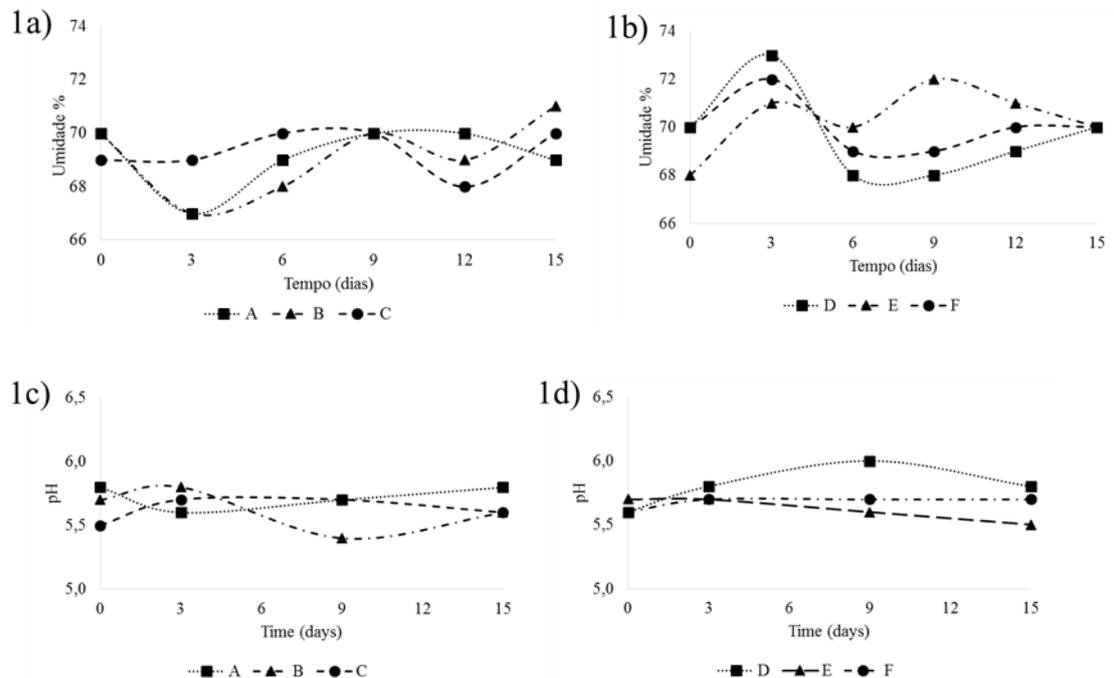


Figura 1–Variação de umidade nos tratamentos sem (1a) e com (1b) contaminação experimental e pH sem (fig. 1c) e com contaminação (fig. 1d)

A avaliação de cor do produto mostrou maiores índices de  $\Delta E$  (tabela 2) para o tratamento com o HMAB, principalmente na variação de  $b^*$ , com índices superiores a 100% nesse parâmetro. A estabilidade da cor da carne fresca fornece uma ideia sobre as possíveis preferências do consumidor com base na aparência do produto, sendo uma propriedade importante que influencia no valor de mercado e na decisão de compra do consumidor (Quevedo et al. 2013), logo esse parâmetro apresentou melhores resultados quando comparado ao produto com sal de cura. Aumento nos valores de  $b^*$  também foram observados quando da adição de quitosana em comparação ao sal de nitrito (Alirezalu et al., 2019). Alguns compostos podem apresentar estabilidade de cor da carne, mesmo quando inserido na dieta animal, por possuírem mecanismos de eliminação de radicais livres, inibindo a oxidação em carne crua e cozida (Abdelmalek et al., 2018). Kaba et al. (2017) avaliaram a vida de prateleira do peixe defumado com azo composto em comparação com açafrão, embora o parâmetro cor não tenha sido mensurado, a aparência na análise sensorial apresentou maior escore para o tratamento com açafrão.

Tabela 2 – Resultados das leituras de colorimetria em linguças de carne de cordeiro

Tratamentos	Variáveis			$\Delta E$
	L*	a*	b*	
A	44,14	10,89	14,00	45,57
B	41,32	9,59	13,22	42,57
C	41,96	17,37	29,74	54,28

L\* - Luminosidade a\* - variação do vermelho ao verde e b\* - variação do amarelo ao azul

### 3.2 Efeito da HMAB sobre a vida de prateleira das linguças

Na análise pareada para a contagem total de microrganismos mesófilos, foi observada uma diferença significativa entre os dias 0 e 12 em todos os tratamentos, com redução das contagens no dia 15 após a adição de conservantes. Na análise entre os tratamentos, não foram observadas diferenças entre as amostras elaboradas com azo composto e nitrito de sódio, exceto nos dias 3 e 9 entre as amostras B e C (Figura 2 e Tabela 3). Além disso, os tratamentos F com HMAB apresentaram diminuição na contagem quando comparados à amostra sem adição de conservante (D), porém com contagens superiores aos tratamentos B e E, que tiveram adição de sal nitrito. Todos os tratamentos, apresentaram contagens acima dos limites aceitáveis de 7  $\log_{10}$  UFC/g (Ryser & Schuman, 2015) no sexto dia, logo nenhum dos tratamentos estariam em condições adequadas para consumo a partir desse tempo experimental. Resultados semelhantes foram observados na contagem de microrganismos psicotróficos (Figura 3 e Tabela 4), indicando um potencial de redução dos compostos da carga microbiana. Ali et al. (2018) obtiveram resultados semelhantes para o grupo controle, com contagem acima do limite aceitável no sexto dia de armazenamento.

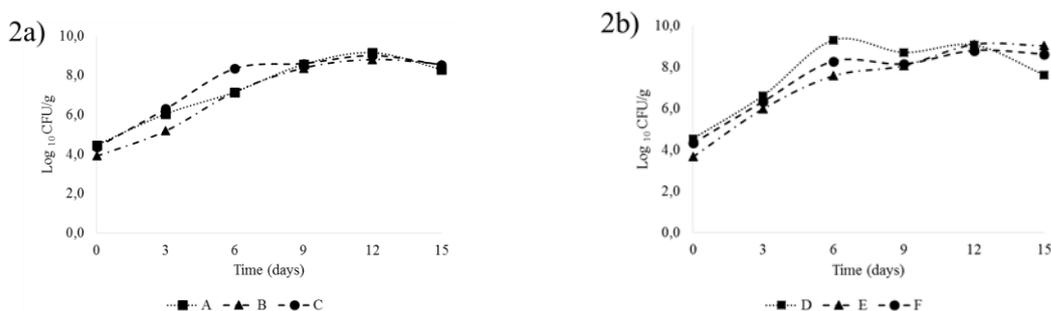


Figura 2 – Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbicos em linguça de cordeiro sem (2a) e após (2b) contaminação experimental.

Tabela 3 - Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbicos em linguiça de cordeiro sem e após contaminação experimental ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g)

	0	3	6	9	12	15
A	4.46 <sup>Aa</sup>	6.04 <sup>ABab</sup>	7.15 <sup>ABa</sup>	8.56 <sup>ABab</sup>	9.15 <sup>Ba</sup>	8.30 <sup>ABa</sup>
B	3.91 <sup>Ab</sup>	5.18 <sup>ABa</sup>	7.15 <sup>ABa</sup>	8.36 <sup>ABa</sup>	8.79 <sup>Bb</sup>	8.56 <sup>ABa</sup>
C	4.36 <sup>Aab</sup>	6.30 <sup>ABb</sup>	8.34 <sup>ABa</sup>	8.60 <sup>ABb</sup>	9.00 <sup>Bab</sup>	8.53 <sup>ABa</sup>
	0	3	6	9	12	15
D	4.54 <sup>Aa</sup>	6.63 <sup>ABa</sup>	9.32 <sup>ABa</sup>	8.72 <sup>ABa</sup>	9.08 <sup>Ba</sup>	7.63 <sup>ABa</sup>
E	3.67 <sup>Ab</sup>	6.00 <sup>ABb</sup>	7.59 <sup>ABb</sup>	8.08 <sup>ABb</sup>	9.11 <sup>Ba</sup>	9.04 <sup>ABb</sup>
F	4.32 <sup>Aab</sup>	6.34 <sup>ABab</sup>	8.28 <sup>ABab</sup>	8.15 <sup>ABab</sup>	8.80 <sup>Ba</sup>	8.63 <sup>ABab</sup>

For each treatment, values followed by the same capital letters did not differ between each other ( $P > 0.05$ );  
 For each period, values followed by the same small letters did not differ between each other ( $P > 0.05$ );



Figura 3 – Contagem total de microrganismos psicrotrófilos em linguiça de cordeiro sem (3a) e após (3b) contaminação experimental.

Tabela 4 - Contagem total de microrganismos psicrotróficos em linguiça de cordeiro sem e após contaminação experimental ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g)

	0	6	12
A	2.86 <sup>Aab</sup>	7.13 <sup>ABa</sup>	9.20 <sup>Ba</sup>
B	2.49 <sup>Aa</sup>	6.50 <sup>ABb</sup>	8.74 <sup>Bb</sup>
C	3.07 <sup>Ab</sup>	6.63 <sup>ABab</sup>	8.84 <sup>Bab</sup>
	0	6	12
D	3.03 <sup>Aab</sup>	9.81 <sup>Ba</sup>	9.24 <sup>ABa</sup>
E	0.00 <sup>Aa</sup>	7.24 <sup>ABa</sup>	7.92 <sup>Bb</sup>
F	3.72 <sup>Ab</sup>	7.30 <sup>ABa</sup>	9.10 <sup>Bab</sup>

For each treatment, values followed by the same capital letters did not differ between each other ( $P > 0.05$ );  
 For each period, values followed by the same small letters did not differ between each other ( $P > 0.05$ );

A multiplicação indesejada de micro-organismos na carne durante o armazenamento, depende principalmente do tipo de microrganismo, carga microbiana inicial e das condições específicas de armazenamento, que podem influenciar no desenvolvimento de diferentes populações microbianas relacionadas à deterioração, afetando tipo e taxa do processo de deterioração (Doulgeraki et al., 2012). Ercolini et al. (2009) identificaram várias estirpes bacterianas com potencial de deterioração em carne refrigerada, entre elas as *Carnobacterium maltaromaticum* e *C. divergens* foram as espécies mais frequentemente encontradas nas populações mesofílica e psicrotrófica. *Pseudomonas* spp. foram comumente identificadas entre os psicrotróficos e *Acinetobacter baumannii*, *Buttiauxella* spp. e *Serratia* spp. entre os isolados mesofílicos. Uma das principais preocupações relacionada aos microrganismos deteriorantes é a disseminação de cepas com alta resistência antimicrobiana. Lerma et al. (2014) isolaram cepas de *P. putida*, *P. lundensis*, *P. fluorescens* e *P. alkylphenolia* de superfícies de abatedouro de caprinos e ovinos com múltipla resistência. Além de alterar as características sensoriais do produto, esses microrganismos podem transferir genes de resistência aos patogênicos, sendo responsáveis por graves surtos de toxinfecções alimentares.

Nas contagens para *S. aureus* (Figura 4a e 4b), a linguiça com o HMAB apresentou contagem inferior ao produto controle, porém com resultados superiores ao tolerado por normativas (BRASIL, 2001) entre os dias 03 e 15. A amostra contendo sal de nitrito apresentou decréscimo de 3 log<sub>10</sub> UFC/g até 15º dia. Os resultados demonstram a alta atividade antimicrobiana sal de nitrito, com efeito superior ao tratamento com o HMAB.

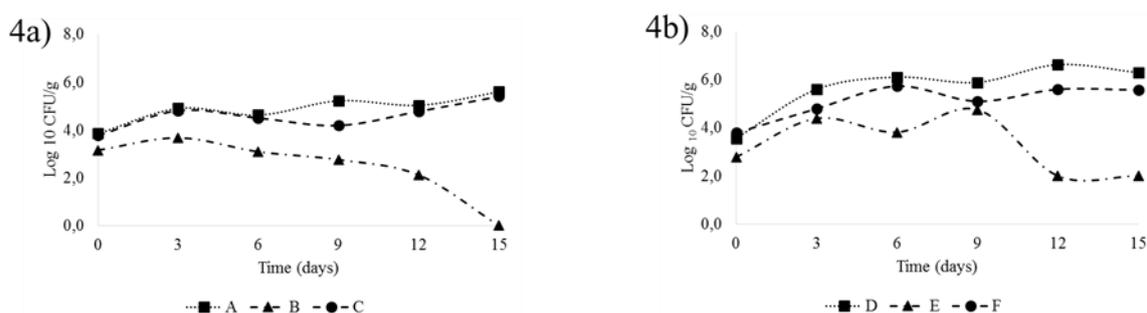


Figura 4 – Contagem de *S. aureus* em linguiça de cordeiro sem (4a) e com (4b) contaminação experimental.

Cardoso-Toset et al. (2017), em experimento com produto cárneo maturado utilizando apenas NaCl e sais de nitrito obtiveram produtos livre dos contaminantes inoculados experimentalmente no final dos testes, demonstrando dados semelhantes aos nossos nas pesquisas de *S. aureus*.

Já nas análises de coliformes totais e termotolerantes (Tabela 3), o HMAB não apresentou ação inibitória, com resultados iguais ou superiores ao grupo controle, porém em nenhum momento experimental, isolou-se *E. coli*.

Tabela 5 – Enumeração de coliformes totais e termotolerantes em linguiça de cordeiro sem e com contaminação experimental por *S. aureus* tratada com HMAB e nitrato de sódio.

Tratamentos	Enumeração de coliformes (NMP)											
	D - 0		D - 3		D - 6		D - 9		D - 12		D - 15	
	Ct	Ctt	Ct	Ctt	Ct	Ctt	Ct	Ctt	Ct	Ctt	Ct	Ctt
A	3,6	3,6	460	460	105	7,2	150	150	93	93	>1100	>1100
B	9,2	3,6	<3,0	<3,0	3,6	3,6	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	9,2	3,6
C	43	<3,0	150	150	>1100	290	75	75	>1100	>1100	93	23
D	93	3,6	210	210	>1000	>1100	>1100	>1100	460	460	>1100	>1100
E	15	<3,0	3,6	3,6	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	9,2	9,2	<3,0	<3,0
F	9,2	3,6	460	1100	1100	1100	1100	>1100	>1100	>1100	1100	1100

Ct – coliforme total; Ctt – Coliforme termotolerante

Kaba et al. (2016) avaliaram o efeito da vida de prateleira de peixe defumado com adição de um azo composto (amarelo crepúsculo FCF) em comparação com um corante natural (açafraão), obtendo amostras dentro dos limites aceitáveis até o 17º dia, sendo observado que os resultados de contagens microbianas não diferiram entre os grupos controle e o com adição de azo composto.

Poucos estudos foram realizados com a finalidade de avaliar o efeito antimicrobiano dos azo compostos. Xu e Zeng (2010) descreveram sete azo compostos com atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos, bem como estudos de docking molecular têm demonstrado que alguns azo compostos tem interação com proteína específica de microrganismos patogênicos, como a proteína quinase (PKs) e ATP sintase (Piotto et al., 2013). Os mesmos autores identificaram 5 compostos com atividade *in vitro* frente a isolados de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. typhimurium*, de origem humana e *P. aeruginosa* ATCC-27853.

## **Conclusões**

Nesse estudo, o HMAB mostrou capacidade de redução da carga microbiana no teste de vida de prateleira de linguiça quando comparado ao produto controle sem adição de conservante, porém quando comparado ao tratamento com nitrito de sódio a 7% teve alta contagem, bem como não apresentou redução na contagem de coliformes. Dessa forma, o produto testado teve baixa eficácia, não apresentando viabilidade para sua utilização isolada como conservante em produtos cárneos. Porém, outros estudos com o composto devem ser realizados, já que o mesmo apresenta atividade antimicrobiana, bem como sua ação conjunta com nitrito de sódio pode ser avaliada para identificar se em teste de vida de prateleira os compostos apresentam efeito sinérgico.

## Referências

- Abdelmalek, Y.B., Essid, I., Smeti, S., Atti, N., 2018. The anti-oxidant and antimicrobial effect of *Rosmarinus officinalis L.* distillation residues' intake on cooked sausages from ewes fed linseed. *Small Rumin. Res.* 168, 87-93.
- Ali, F., Abdel-Atty, N., Helmy, E., 2018. Improving the quality and extending the shelf life of chilled fresh sausages using natural additives and their extracts. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 7(6), 580-585.
- Alirezalua, K., Hesarib, J., Nematic, Z., Munekatad, P.E.S., Barbae, F.J., Lorenzo, J.M., 2019. Combined effect of natural antioxidants and antimicrobial compounds during refrigerated storage of nitrite-free frankfurter-type sausage. *Food Res. Int.* 120, 839-850.
- APHA, 2015. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* 5th ed. American Public Health Association Washington DC 676pp.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4 de 31 de março de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de lingüiça. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, 5 de abril de 2000.
- BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões microbiológicos para alimentos. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 28/01/2019
- Cardoso-Toset, F., Luque, I., Morales-Partera, A., Galan-Relaño, A., Barrero-Domínguez, B., Hernandez, M., Gomez-Laguna, J., 2017. Survival of *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Trueperella pyogenes* in dry-cured Iberian pork shoulders and loins. *Food Microbiol.* 61, 66-71.
- Deb, T., Ganguly, D., Sen, S., Giri, P., Dhar, P., Das, S., 2018. Modification of the toxicity of an azo compound through complex formation help target bacterial strains. *J. Chem. Sci.* 130, 94.
- Doulgeraki, A.I., Papaioannou, M., Nychas, G.E., 2016. Targeted gene expression study of *Salmonella enterica* during biofilm formation on rocket leaves. *LWT - Food Sci. Technol.* 65, 254-260.
- Downham, A., Collins, P. Colouring our foods in the last and next millennium. *International journal of food science & technology*, v. 35, n. 1, p. 5-22, 2000.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., Villani, F., 2009. Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro and in Beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1990-2001.
- Garcia-Segura, S., Dosta, S., Guilemany, J.M., Brillas, E., 2013. Solar photoelectrocatalytic degradation of Acid Orange 7 azo dye using a highly stable TiO<sub>2</sub> photoanode synthesized by atmospheric plasma spray. *Appl Catal B-Environ.* 132, 142-150.

Instituto Adolfo Lutz, 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed., versão digital. São Paulo, 1020pp.

Kaba, N., Özer, O., Çorapçı, B., 2017. Effects of Natural and Artificial Colorants on Hot Smoked Garfish-*Belone belone* (Linnaeus,1761)-Stored at  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Journal of Aquatic Food Product Technology 26(10), 1233-1243.

Karabacak Ç, Tilki T, Tuncer BO, Cengiz M., 2015. Antimicrobial pyrazole dyes: synthesis, characterization, and absorption characteristics. Res Chem Intermed, 41, 1985–1999.

Leal, C.S.M., 2011. Solubilidade de corantes azo. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química Industrial, Universidade da Beira Interior, Covilhã.

Lerma, L.L., Benomar, N., Muñoz, M.C.C., Gálvez, A., Abriouel, H., 2014. Antibiotic Multiresistance Analysis of Mesophilic and Psychrotrophic *Pseudomonas* spp. Isolated from Goat and Lamb Slaughterhouse Surfaces throughout the Meat Production Process. J Appl Environ Microbiol. 80 (21), 6792–6806.

Majou, D. and Christieans, S., 2018. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. Meat Sci. 145, 273–284.

Martínez Suárez, J.F., 2017. Comportamiento electroquímico de colorantes antraquinónicos, azul de metileno, y compuestos afines en solución de solventes no-acuosos. 324 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doctorado En Ciencias Exactas, Área Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires.

Mkpenie, V., Ebong, G., Obot, I.B., Abasiokong, B., 2008. Evaluation of the Effect of Azo Group on the Biological Activity of 1-(4-Methylphenylazo)-2-naphthol. E-J. Chem. 5(3), 431-434.

Negi, P.S., 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. Int. J. Food Microbiol. 156, 7-17.

Piotto, S., Concilio, S., Sessa, L., Porta, A., Calabrese, E.C., Zanfardino, A., Varcamonti, M., Iannelli, P., 2013. Small azobenzene derivatives active against bacteria and fungi. Eur J Med Chem, 68, 178-184.

Quevedo, R., Valencia, E., Cuevas, G., Ronceros, B., Pedreschi, F., Bastías, J.M., 2013. Color changes in the surface of fresh cut meat: A fractal kinetic application. Food Res. Int. 54, 1430–1436.

Ruiz-Capillas, C., Tahmouzi, S., Triki, M., Rodríguez-Salas, L., Jiménez-Colmenero, J., Herrero, A.M., 2015. Nitrite-free Asian hot dog sausages reformulated with nitrite replacers. J. Food Sci. Technol. 52(7), 4333–4341.

Ryser, E.T., Schuman, J.D., 2015. Mesophilic aerobic plate count. In: Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. (eds.) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D. C. Chapter 8, 95-101.

Scapin, G., Schimdt, M.M., Prestes, R.C., Ferreira, S., Silva, A.F.C., Rosa, C. S., 2015. Effect of extract of chia seed (*Salvia hispanica*) as an antioxidant in freshpork sausage. *Int. Food Res. J.* 22(3), 1195-1202.

Valerinia, D., Tammaroa, L., Di Benedettoa, F., Vigliottab, G., Capodiecia, L., Terzia, R., Rizzoa, A., 2018. Aluminum-doped zinc oxide coatings on polylactic acid films for antimicrobial food packaging. *Thin Solid Films*, 645, 187-192.

Xu, H., Zeng. X., 2010. Synthesis of diaryl-azo derivatives as potential antifungal agentes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*20, 4193-4195.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Pode-se observar a contaminação das carnes analisadas neste estudo por patógenos relevantes, como *S. aureus* ou *E. coli*;
- A capacidade de produção de biofilme observada nas cepas, aponta para uma maior resistência aos agentes antimicrobianos. Assim, é fundamental ampliar a fiscalização em mercados públicos para evitar a comercialização de produtos cárneos de forma irregular;
- O 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno apresentou ação antimicrobiana e antibiofilme frente aos isolados de *S. aureus*, sendo um promissor produto para controle desse microrganismo;
- A ação sinérgica 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno com o nitrito de sódio apresentou uma redução considerada na concentração dos compostos, testes com as doses menores devem ser realizados em produtos cárneos visando avaliar sua eficácia;
- A toxicidade apresentada em *Artemia salina* é considerada apenas uma etapa para a utilização do produto, porém como o 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno apresentou efeito sinérgico com o sal de nitrito, essas novas concentrações devem ser avaliadas em conjunto;
- O 4-Hidroxi-2-metilazobenzeno apresentou baixa eficácia em teste de vida de prateleira, porém como o mesmo é um composto com ação antimicrobiana e antibiofilme, sua utilização deve ser considerada para outros fins, como em segmentos que não envolvam o seu consumo, como uso em desinfetantes e sanitizantes de equipamentos, principalmente aqueles que apresentam superfícies com aderência de biofilmes bacterianos.

