

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE
FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

KATIANA HENNING

**EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS PRODUZIDOS EM
FRANCISCO BELTRÃO, PARANÁ: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,
MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA**

FRANCISCO BELTRÃO – PR

Junho - 2019

KATIANA HENNING

**EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS PRODUZIDOS EM FRANCISCO
BELTRÃO, PARANÁ: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E
PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador(a): Profa Dra. Kérley Braga Pereira Bento Casaril

FRANCISCO BELTRÃO – PR

Junho - 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Henning, Katiana

Embutidos cárneos fermentados produzidos em Francisco Beltrão, Paraná: avaliação físico-química, microbiológica e perfil de resistência bacteriana / Katiana Henning; orientador(a), Kérley Braga Pereira Bento Casaril , 2019. 62 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2019.

1. Embutidos cárneos fermentados. 2. Padrão microbiológico. 3. Padrão físico-químico. 4. Resistência bacteriana. I. Braga Pereira Bento Casaril , Kérley. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

KATIANA HENNING

**EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS PRODUZIDOS EM FRANCISCO
BELTRÃO, PARANÁ: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E
PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Profa. Dra. Kérley Braga Pereira Bento Casaril
UNIOESTE- Francisco Beltrão

Membro da banca: Profa. Dra. Cleusa Inês Weber
UTFPR-Francisco Beltrão

Membro da banca: Profa. Dra. *Luciana Bill Mikito Kottwitz*
UNIOESTE-Cascavel

FRANCISCO BELTRÃO, PR
Junho - 2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me dar saúde, sabedoria e capacidade para superar os desafios e conseguir concluir mais esta etapa.

À minha orientadora e amiga, professora Kérley Braga Pereira Bento Casaril, pelo incentivo, ajuda, parceria, orientação e conhecimento compartilhado.

Aos meus pais, Felipe e Terezinha, pelo amor incondicional, pela educação e por nunca medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Pelo exemplo de vida, coragem, persistência, trabalho e honestidade.

Ao meu marido, Anderson, por acreditar em mim, pelo apoio, paciência e sempre me incentivar.

A toda minha família, por torcerem por mim e me incentivarem sempre.

Às professoras Dra. Cleusa Inês Weber e Dra. Luciana Bill Mikito Kottwitz pelas contribuições na banca de qualificação.

À Coordenação da Estação Experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR- Campus Francisco Beltrão pela parceria na realização das análises físico-químicas.

Às técnicas dos laboratórios, Carol e Dona Norma pela amizade e pela ajuda com as análises.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão dessa etapa.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IN – Instrução Normativa
pH – Potencial Hidrogênioônico
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
NMP – Número Mais Provável
UFC – Unidade Formadora de Colônia
Aa – Atividade de Água
DTA – Doença Transmitida por Alimento
OMS – Organização Mundial da Saúde
SIM – Serviço de Inspeção Municipal
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
IAL – Instituto Adolfo Lutz
CLST – Caldo Lauril Sulfato Triptose
CVB – Caldo Verde Brilhante
EC – Caldo *Escherichia coli*
EMB – Ágar Eosina Azul de Metileno
VM – Vermelho de Metila
VP – Voges Proskauer
TSI – Ágar Tríplice Açúcar Ferro
BPW – Água Peptonada Tamponada
RV – Rappaport Vassilidis
MKTT – Tetrionato Muller-Kauffmann
XLD – Ágar Xilose Lisina Desoxicolato
HE – Ágar Hektoen Entérico
BP – Ágar Baird-Parker
BHI – Ágar Infusão Cérebro e Coração
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
MH – Ágar Mueller Hinton
ATCC – American Type Culture Collection

EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS PRODUZIDOS EM FRANCISCO BELTRÃO, PARANÁ: AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Resumo

O consumo de embutidos cárneos fermentados no Brasil, em especial, no município de Francisco Beltrão é bastante apreciado, principalmente, os conhecidos como linguiça/salame colonial devido a fatores como o preço, a conveniência de compra e, principalmente, pela influência das culturas alemã e italiana. No Brasil, os embutidos crus, fabricados a partir de carne de suínos, bovinos ou aves, apresentam muita alteração na qualidade final no que se refere aos aspectos de apresentação, composição centesimal e valor nutritivo. Diante disso, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a qualidade físico-química e microbiológica de embutidos cárneos fermentados produzidos no município de Francisco Beltrão-PR, bem como o perfil de resistência das bactérias isoladas desses produtos. Para tanto, amostras de embutidos cárneos fermentados (n=18) foram submetidas às seguintes análises microbiológicas: contagem de coliformes totais, contagem de coliformes termotolerantes e confirmação de *Escherichia coli*, pesquisa de *Salmonella* spp., contagem de *Staphylococcus* spp., pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva e perfil de resistência bacteriana, bem como análises físico-químicas de pH, umidade, cinzas, proteínas e lipídeos. Quanto aos parâmetros físico-químicos, em relação ao potencial hidrogeniônico (pH), as amostras apresentaram médias que variaram entre 4,88 e 5,72. Os teores de umidade dos embutidos cárneos fermentados avaliados variaram entre 43,58% e 64,09%. Os resultados do parâmetro de resíduo mineral fixo (cinzas) das amostras de embutidos cárneos fermentados encontrados variaram entre 3,05% e 5,49%. O teor de proteínas para as amostras analisadas variou entre 16,75% e 28,98%. Com relação ao teor de gorduras observou-se variação entre 3,14% e 15,29% nas amostras avaliadas, portanto, 100% das amostras encontram-se de acordo com a Instrução Normativa nº 22 de 2000. Os resultados apresentados para os parâmetros físico-químicos demonstram que houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre grande parte das amostras avaliadas. Em relação aos parâmetros microbiológicos, todas as amostras analisadas apresentaram coliformes totais e coliformes termotolerantes. Do total de amostras analisadas 39% apresentaram contagens de coliformes totais > 1100 NMP. g^{-1} e 28% apresentaram contagens de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação vigente. Verificou-se também que 39% apresentaram contaminação por *E. coli* e 61% por *Salmonella* spp. A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva foi confirmada em 39% das amostras analisadas. Foram obtidos 25 isolados microbianos contendo estirpes de *E. coli* (n=7), *S. aureus* (n=7) e *Salmonella* (n=11). Em relação ao perfil de resistência, do total de microrganismos isolados 16% não apresentaram resistência a nenhum dos antimicrobianos testados, enquanto os demais (84%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos e em alguns isolados de *Salmonella* spp. observou-se a presença de multirresistência o que é um grave problema de saúde pública. Os resultados desta pesquisa permitem concluir que as amostras analisadas apresentam grande variabilidade nos parâmetros físico-químicos, os quais podem indicar ausência de padronização do processo de produção. Em relação as análises microbiológicas, observa-se grande contaminação o que indica a necessidade de adoção de medidas

preventivas de controle e implantação de Boas Práticas de Fabricação. Em relação ao teste de sensibilidade a antimicrobianos a maioria dos microrganismos isolados apresentou resistência a pelo menos um antimicrobiano testado e o alto índice de isolados resistentes aumenta a preocupação em relação ao uso indiscriminado de antimicrobianos e aos níveis de multirresistência.

Palavras-chave: embutidos cárneos fermentados, padrão microbiológico, padrão físico-químico, resistência bacteriana.

FERMENTED MEAT SAUSAGES PRODUCED IN FRANCISCO BELTRÃO – PARANÁ TOWN: PHYSICOCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL ANALISYS, AND BACTERIAL RESISTANCE PROFILE

Abstract

The consumption of fermented meat sausages in Brazil, especially in the municipality of Francisco Beltrão is highly appreciated, especially those known as colonial sausage/salami due to factors such as price, convenience of purchase and, mainly, by the influence of German and Italian cultures. In Brazil, raw sausages, made from pork, beef or poultry meat, show a great deal of change in the final quality in terms of presentation, centesimal composition and nutritional value. For this purpose, samples of fermented meat sausage (n = 18) were submitted to the following microbiological analysis: count of total coliforms, count of thermotolerant coliforms, confirmation of *Escherichia coli*, survey of *Salmonella* spp., counts of *Staphylococcus* spp. and survey *Staphylococcus* coagulase positive and bacterial resistance profile, as well as, physical-chemical analysis of pH, moisture, ash, proteins and lipids. Regarding the physical-chemical parameters, in relation to the hydrogen potential (pH), the samples had averages ranging from 4.88 to 5.72. The moisture contents of the fermented meat sausages evaluated varied between 43.58% and 64.09%. The results of the parameter of fixed mineral residue (ash) of the samples of fermented meat sausages found ranged from 3.05% to 5.49%. The protein content for the analyzed samples ranged from 16.75% to 28.98%. Regarding the fat content, variation between 3.14% and 15.29% was observed in the samples, so 100% of the samples were found in accordance with Normative Instruction No. 22 of 2000. The results presented for the physical-chemical parameters show that there was a significant difference ($p > 0.05$) among most of the samples evaluated. Regarding the microbiological parameters, all samples analyzed had total coliforms and thermotolerant coliforms. Of the total samples analyzed, 39% presented total coliforms higher than 1100 MPN/g and 28% presented counts of thermotolerant coliforms higher than allowed by current legislation. It was also found that 39% presented contamination by *E. coli* and 61% by *Salmonella* spp. The presence of *Staphylococcus* coagulase positive was confirmed in 39% of the samples analyzed. Were obtained 25 microbial isolates containing *E. coli* (n = 7), *S. aureus* (n = 7) and *Salmonella* spp. (n = 11) isolated of fermented meat sausages. Regarding the resistance profile, 16% did not present resistance to any of the antimicrobials tested, while the others (84%) presented resistance to at least one of the antimicrobials and in some isolates of *Salmonella* spp. it was observed the presence of multiresistance which is a serious public health problem. The results of this research allow us to conclude that the analyzed samples show great variability in the physical-chemical parameters, which may indicate the absence of standardization of the production process. In relation to the microbiological analyzes, a great contamination is observed indicating the need to adopt preventive measures to control and implement Good Manufacturing Practices. Regarding the antimicrobial susceptibility test, most of the isolated microorganisms presented resistance to at least

one antimicrobial tested and the high index of resistant isolates increases the concern regarding the indiscriminate use of antimicrobials and the levels of multiresistance.

Keywords: fermented meat sausage, microbiological standard, physical-chemical standard, bacterial resistance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 PRODUTOS CÁRNEOS EMBUTIDOS FERMENTADOS.....	13
1.2 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS PARA SALAMES E LINGUIÇA COLONIAL.....	18
1.3 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DE EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS.....	20
1.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	23
2. OBJETIVOS	25
2.1 Geral.....	25
2.2 Específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 AMOSTRAGEM.....	26
3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	26
3.2.1 Análise de pH.....	26
3.2.2 Determinação de Umidade.....	27
3.2.3 Determinação de Cinzas.....	27
3.2.4 Determinação de Proteínas.....	28
3.2.5 Determinação de Lipídeos.....	29
3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	29
3.3.1 Preparo das amostras.....	30
3.3.2 Determinação de Coliformes Totais.....	30
3.3.3 Determinação de Coliformes Termotolerantes.....	30
3.3.4 Confirmação de <i>Escherichia coli</i>	31
3.3.5 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	31
3.3.6 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. e pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	31
3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS (TSA).....	32
4. REFERÊNCIAS	34
5. ARTIGO CIENTÍFICO 01	40
6. ANEXOS	49
6.1 Anexo A – Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia.....	49

6.2 Anexo B - Confirmação da Submissão.....	61
6.3 Anexo C – e-mail de confirmação da submissão.....	62

1. INTRODUÇÃO GERAL

Entende-se por produto colonial, o que possui algum grau de processamento realizado nas propriedades rurais, geralmente de produção familiar, através de um processo artesanal de produção, tais como sucos e vinhos, doces e geleias de frutas, conservas de hortaliças, pães caseiros, massas e biscoitos, açúcar mascavo, queijo colonial, salame colonial, linguiça colonial, patê, torresmo, dentre outros (DORIGON; RENK, 2011).

Por serem considerados, pela população, mais naturais e saborosos, o consumo de produtos coloniais é uma tradição na região Sul do Brasil, em especial, no Sudoeste do Paraná (CASARIL et al., 2017). Dentre os produtos mais apreciados estão os embutidos, como os salames e as linguiças coloniais. Os quais em se tratando de embutidos coloniais são produtos de grande aceitação por fatores como preço, conveniência de compra e, principalmente, pela influência das culturas alemã e italiana (RITTER et al., 2003; MAGRO; KLEIN, 2006).

1.1 PRODUTOS CÁRNEOS EMBUTIDOS FERMENTADOS

Os produtos cárneos são aqueles obtidos a partir da carne fresca os quais passam por um ou mais tipos de tratamentos. Esses tratamentos podem ser biológicos, químicos ou físicos, ou ainda pela associação destes métodos. O tratamento da carne fresca pretende, além da produção de novos produtos, a diminuição da perecibilidade, de problemas com o transporte e com o armazenamento, além de benefícios com relação ao aumento do prazo de validade (BENEVIDES; NASSU, 2017).

Os embutidos são definidos como todos os produtos produzidos com carne ou órgãos comestíveis curados ou não, condimentados, cozidos ou não, defumados e dessecados ou não, possuindo envoltório natural ou artificial (BRASIL, 1997). A fabricação dos embutidos proporciona o aumento do prazo de validade das carnes, além de diferenciar a oferta de derivados (GEORGES, 2015).

Os embutidos cárneos podem ser classificados em: cozidos e crus. Os cozidos passam por um processo de cozimento como método de conservação, enquanto que os crus não passam por processo de cozimento. No entanto, os embutidos crus sofrem um processo de desidratação parcial, o qual normalmente é feito por agentes de cura

ou por processo fermentativo através da ação das bactérias ácido lácticas, tendo como objetivo aumentar o tempo de conservação (SANTOS, 2008).

No Brasil, os embutidos crus, fabricados a partir de carne de suínos, bovinos ou aves, demonstram muita alteração na qualidade final no que se refere aos aspectos de apresentação, composição centesimal e valor nutritivo (GEORGES, 2015).

Ainda que no passado o processo de cura fosse utilizado como uma forma de preservação da carne, hoje ele tem sido empregado para o aprimoramento da cor e do sabor dos produtos (JAY, 2005).

Sendo assim, a cura é uma técnica de conservação amplamente utilizada desde a antiguidade para aumentar a validade de produtos alimentares (MARCO; NAVARRO; FLORES, 2006).

De acordo com Jay (2005)

Os ingredientes usados na cura são o cloreto de sódio, açúcares como sacarose ou glicose e nitrito ou nitrato, sendo o ingrediente mais importante o cloreto de sódio. Além desses, alguns produtos podem conter coadjuvantes, tais como fosfatos, ascorbato ou eritorbato de sódio, sorbato de potássio, glutamato monossódico, proteínas vegetais hidrolisadas, lactases e temperos (JAY, 2005, p. 105).

Os ingredientes acima mencionados resultam na melhoria das propriedades sensoriais, como sabor e aroma mais agradáveis, além de uma coloração vermelha ou rósea atraente (LIMA, 2016).

A fermentação é um dos métodos mais antigos utilizados pelo homem como forma de transformação e conservação de alimentos. Vários produtos finais da fermentação, especialmente ácidos e álcoois, inibem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos que podem contaminar os alimentos (TEIXEIRA, 2013; SIPP, 2015).

Para Jay (2005)

Os embutidos fermentados geralmente são categorizados como secos ou semi-secos, embora alguns possam ser classificados como intermediários. Embutidos secos contêm de 30 a 40% de umidade, não são defumados ou processados a quente e normalmente são consumidos sem cozimento. Os embutidos fermentados semi-secos são submetidos a tempos menores de secagem, contêm em torno de 50% de umidade e são aquecidos a uma temperatura interna de 60°C a 68°C durante a defumação (JAY, 2005, p.111).

O produto fermentado utiliza o crescimento controlado de microrganismos selecionados, resultando na modificação da textura, do sabor e do aroma. Dentre os tipos de fermentações utilizadas para produtos cárneos, a fermentação láctica é a

mais empregada, no qual o ácido láctico é produzido pela ação das bactérias sobre os açúcares, abaixando o pH e fornecendo sabor característico ao produto. Dentre os produtos cárneos produzidos por este processo, o salame é um dos mais consumidos (BENEVIDES; NASSU, 2017).

Com a intenção de padronizar a qualidade final dos produtos cárneos curados, a partir de 1961, passou-se a utilizar culturas puras de microrganismos chamadas de culturas *starters* ou iniciadoras. O uso destas culturas é importante na fabricação de salame, pois as mesmas auxiliam no controle da contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos, o que aumenta o prazo de validade do produto, além de contribuírem para a diminuição do tempo de fabricação e conferirem melhor cor, aroma e sabor ao produto final (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000; CAMPAGNOL, 2007).

Em produtos cárneos fermentados, os microrganismos são divididos em dois grupos: bactérias ácidas lácticas, responsáveis pelo processo de acidificação, e microrganismos responsáveis pelo aroma, que são capazes de reduzir nitrato a nitrito. No primeiro grupo encontram-se os *Lactobacillus* e *Pediococcus* e no segundo, a família *Micrococcaceae* e os gêneros *Staphylococcus*, *Kocuria*, seguidos de leveduras e fungos filamentosos (JESSEN, 1995 apud CAMPAGNOL, 2007).

A preservação de produtos à base de carne por fermentação tem sido usada por centenas de anos. As culturas iniciais têm um papel muito importante na produção de produtos cárneos de alta qualidade devido ao seu efeito sobre o pH, ao desenvolvimento desejado, bem como no fornecimento de estabilidade e segurança. Portanto, é importante determinar qual cultura inicial ou combinações devem ser usadas para fabricar produtos de carne seguros e de alta qualidade para os consumidores (ERTURKMEN; KILIC; KILIC, 2018).

A principal condição para uma cultura de microrganismos ser iniciadora ou bioprotetora é não causar prejuízo à saúde do consumidor, seja por causar infecção ou pela produção de toxinas (GEISEN, 1992 apud MORCELI, 2003).

O processo de fabricação dos embutidos fermentados compreende a moagem da carne *in natura* e toucinho crus (em granulometria variável conforme o tipo de produto), a mistura com condimentos e alguns aditivos como sal, açúcar e agentes de cura, o embutimento em tripas, a maturação e a desidratação em condições controladas de temperatura e umidade (BRASIL, 2000; TEIXEIRA, 2013).

O Brasil é conhecido como um grande produtor de embutidos cárneos

fermentados, sendo que em cada região os produtos são produzidos de forma diferente. Essa diferença está associada ao calibre e ao grau de moagem dos ingredientes, ao período de maturação e se passou ou não pelo processo de defumação, além da composição e aos tipos de condimentos apresentados em cada embutido. A qualidade dos embutidos é determinada em relação à atividade de água, a umidade presente, quantidade de lipídios e açúcares que compõem o produto, além da cor e sabor característicos (CACCIOPPOLI et al., 2006; SIPP, 2015).

Os embutidos crus, curados e fermentados, como o salame e as linguiças coloniais, encaixam-se nas tendências atuais de consumo da população devido ao fato de serem prontos para o consumo, fáceis de conservar, podem ser utilizados individualmente ou para acompanhamento em preparações culinárias, têm caráter nutritivo e variadas formas de apresentação e sabor (MACEDO, 2005; MACEDO et al., 2008; FIEIRA, 2014).

O salame é um tradicional produto cárneo fermentado. No Brasil, a fabricação do salame teve início com a imigração Italiana, no Sul do país, região onde o clima propício foi um forte aliado para produção caseira, que com o passar do tempo, originou as pequenas fábricas (TERRA; FRIES; TERRA, 2004 apud TEIXEIRA, 2013).

O salame, segundo a Instrução Normativa (IN) nº 22, de 31 de julho de 2000 “é o produto cárneo industrializado obtido de carne suína ou suína e bovina adicionado de toucinho e especiarias, posteriormente embutido em envoltórios naturais e/ou artificiais, curtido, fermentado, maturado, defumado ou não e dessecado” (BRASIL, 2000).

Os salames coloniais são elaborados com carnes cruas que não passam por cocção ao longo do processamento e, nem, previamente ao consumo. Segundo Oliveira e Mendonça (2004) a segurança microbiológica desses produtos resulta da associação de obstáculos, como a baixa atividade de água, a adição de nitrito e cloreto de sódio, baixo pH e presença de substâncias antimicrobianas formadas durante o processamento, bem como de excelentes condições higiênicas no seu processamento tecnológico. A união destes obstáculos é capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias deteriorantes e de muitos patógenos (DALLA SANTA, 2008; GOTTARDO et al., 2011).

O salame é um embutido classificado como um produto curado, fermentado cru, seco ou semi-seco, maturado, dessecado e não emulsionado (BRASIL, 2000).

A matéria-prima é a carne suína e/ou suína e bovina, moídas e misturadas em diferentes proporções, com variações quanto à composição e à adição de diferentes condimentos (KLEIN et al., 2006). A diferenciação entre os tipos de salame baseia-se na matéria-prima (exclusivamente carne suína ou junção de carnes suína e bovina), na granulometria da carne e do toucinho (fina, média ou grossa), na condimentação e na aplicação ou não de defumação (BRASIL, 2000).

A Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), define os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de oito tipos de salame: Salaminho, Salame tipo Alemão, Salame tipo Calabrês, Salame tipo Friolano, Salame tipo Napolitano, Salame tipo Hamburguês, Salame tipo Italiano, Salame tipo Milano. Vale ressaltar que o salame colonial não está incluído nessa instrução normativa e, portanto, ainda não possui os regulamentos técnicos de identidade e qualidade. A secretaria de agricultura do Município de Francisco Beltrão segue a Lei municipal nº 4411 de 2016, para realizar a fiscalização das agroindústrias produtoras de embutidos cárneos fermentados, a qual foi elaborada a partir da IN nº 22.

Nesta mesma legislação foram aprovadas as características de Identidade e Qualidade da Linguiça Colonial, definida como produto cárneo industrializado, elaborado exclusivamente a partir de carnes suínas, adicionado de toucinho, ingredientes, moído em granulometria variável, embutida em envoltório natural, curado, que sofre um processo rápido de fermentação, defumado e dessecado por tempo indicado pelo processo de fabricação (BRASIL, 2000). Portanto, trata-se de um produto curado, defumado e dessecado.

A Linguiça Colonial apresenta como ingredientes obrigatórios em sua formulação a presença de carne suína, toucinho, sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio. Os açúcares, maltodextrinas, leite em pó, culturas *starters*, aditivos intencionais, vinho, condimentos, aromas e especiarias são ingredientes opcionais (BRASIL, 2000).

De acordo com Kaipers (2017) a linguiça colonial exhibe vantagem em relação aos demais embutidos fermentados, pois não requer tempo de maturação para ser consumida, neste caso a fermentação e a defumação ocorrem simultaneamente com a secagem da tripa em estufa, chamada de fermentação por defumação úmida.

A linguiça colonial chegou ao Brasil em 1911, em Bragança Paulista, onde foi comercializada inicialmente por uma italiana, Palmira Boldrini, em seguida espalhou-

se pelo país (SIMÕES et al., 2009).

Um dos produtos cárneos muito produzidos no Brasil, as linguiças coloniais, são fáceis de fabricar, pois possuem tecnologia simples e baixo custo (PERLIN et al., 2015).

Em relação aos parâmetros físico-químicos para salames e linguiça colonial, a qualidade desses produtos é avaliada em função dos teores de umidade, gordura, proteína, carboidratos e atividade de água (BRASIL, 2000; THOMÉ et al., 2015). Na Tabela 1 estão descritos os requisitos máximos e mínimos, relacionados às características físico-químicas, determinadas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, que fixa os padrões de identidade para os produtos denominados de “Linguiça Colonial” e “Salame” produzidos no Brasil (BRASIL, 2000). Observa-se que a linguiça colonial não apresenta valores máximos de umidade e nem de atividade de água.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos determinados pela legislação para Linguiça Colonial e Salame.

Parâmetros	Linguiça Colonial	Salame
Umidade Máx.	-----	40%
Gordura Máx.	30%	35%
Proteína Mín.	18%	20%
Carboidratos Totais* Máx.	1,5%	1,5%
Atividade de água (Aa) Máx	-----	0,92

Fonte: BRASIL, 2000 e *BRASIL, 2003

1.2 PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS PARA SALAMES E LINGUIÇAS COLONIAIS

Com a intenção de proteger a saúde dos consumidores, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabeleceu os padrões microbiológicos sanitários para a presença de alguns grupos ou espécies de microrganismos, nas diversas categorias de alimentos destinados ao consumo humano, por meio do Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. De acordo com a legislação brasileira, os parâmetros microbiológicos para produtos cárneos maturados os quais incluem diferentes tipos de salames e linguiça colonial devem estar conforme os padrões descritos na RDC nº 12 de 2001, a qual estabelece o limite máximo de 10^3 NMP/g

para coliformes termotolerantes, $5,0 \times 10^3$ UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* spp. em 25g de alimento para que o produto seja próprio para o consumo humano (BRASIL, 2001).

Os microrganismos possuem um papel fundamental quando se referem a alimentos, pois algumas espécies quando presentes em alimentos podem causar alterações benéficas, modificando suas características originais de maneira a transformá-lo em um novo alimento. Também podem causar a chamada deterioração microbiana dos alimentos, alterando características do produto como, cor, odor, sabor, textura e aspecto. Outras espécies de microrganismos ou suas toxinas quando presentes nos alimentos podem causar danos à saúde do homem (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

A estabilidade microbiológica dos embutidos fermentados, como os salames e as linguiças coloniais, é adquirida durante o processamento, pela sequência de obstáculos à sobrevivência e ao desenvolvimento de microrganismos. A conservação acontece devido à ação antimicrobiana da mistura de condimentos e nitrito e, em menor grau ao sal adicionado; a presença de ácido láctico oriundo da fermentação e, conseqüentemente a redução do pH; ao aquecimento durante a defumação e os agentes antimicrobianos da fumaça quando o produto é defumado; à redução na atividade de água devido ao sal e à secagem; e às baixas temperaturas de armazenamento (FELLOWS, 2006 apud TEIXEIRA 2013).

A ação antimicrobiana de muitos condimentos parece estar associada aos compostos fenólicos extraídos de seus óleos essenciais. (BURT, 2004; SANTURIO et al., 2011). Sugere-se que o efeito antibacteriano dos óleos essenciais não seja atribuído a um mecanismo específico, mas esteja envolvido com vários alvos nas células sensíveis, considerando o grande número de diferentes grupos e compostos químicos presentes nos óleos. As principais ações seriam a degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática, perda de constituintes celulares e coagulação do citoplasma (BURT, 2004).

Segundo Magnani (2001), os compostos fenólicos agem em todas as fases do crescimento microbiano, estendendo a fase lag; reduzindo a taxa de crescimento e o rendimento total da célula durante a fase logarítmica.

As especiarias mais utilizadas na produção de embutidos cárneos fermentados são pimenta preta, pimenta branca, alho, noz-moscada, cebola, cravo, canela, e orégano, variando em presença e quantidades dependendo do fabricante (ZANETTE,

2010).

Geralmente os óleos essenciais que possuem maior atividade antimicrobiana apresentam maiores concentrações de eugenol, carvacrol e timol, os quais têm sido identificados como principais elementos em cravo, canela e orégano (MAGNANI, 2001; BURT, 2004).

Vários fatores como composição e concentração do condimento empregado, número e espécie de microrganismos contaminantes presentes e composição do substrato, interferem na capacidade de ação antimicrobiana dos condimentos (MAGNANI, 2001). Além de ação antimicrobiana alguns condimentos possuem outra propriedade de interesse para alimentos, a propriedade antioxidante (MAGNANI, 2001).

A composição química da carne é um ótimo meio de cultura, pois é rica em substâncias minerais e nitrogenadas e possui grande quantidade de água e fatores de crescimento essenciais ao desenvolvimento da maioria dos microrganismos (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

A qualidade dos alimentos é uma das condições essenciais para a promoção e manutenção da saúde do consumidor (BERGAMINI et al., 2015).

Uma grande variedade de microrganismos patogênicos pode causar toxinfecções alimentares. Normalmente, os microrganismos mais comuns que causam doenças transmitidas por alimentos são bactérias, toxinas bacterianas, vírus e parasitas (SARAIVA et al., 2016).

Os cuidados em toda a cadeia produtiva dos embutidos cárneos fermentados, desde a produção da matéria-prima, no processamento, nos equipamentos e utensílios higienizados, a temperatura adequada, bem como, as condições higiênico-sanitárias dos manipuladores e o armazenamento do produto acabado, influenciarão no controle dos microrganismos deteriorantes e patogênicos (DALLA SANTA, 2008).

1.3 MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DE EMBUTIDOS CÁRNEOS FERMENTADOS

Entre os microrganismos constantemente presentes em embutidos cárneos fermentados destacam-se *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Embutidos cárneos fermentados como linguiças coloniais e salame podem representar risco à saúde pública, em virtude da presença de agentes

patogênicos, os quais são causas comuns de toxinfecções alimentares (GOTTARDO et al., 2011; PERLIN et al., 2015).

Segundo Franco e Landgraf (2002) microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Podem ser utilizados para refletir a qualidade microbiológica dos alimentos em relação ao prazo de validade ou à segurança, neste último caso, devido à presença de patógenos alimentares. Em geral, os microrganismos indicadores podem ser utilizados para analisar fatores de segurança e qualidade microbiológica dos alimentos (JAY, 2005).

Dentre os microrganismos indicadores encontram-se os coliformes que podem ser agrupados em coliformes totais e termotolerantes. Os coliformes totais são definidos como bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, Gram-negativas, não formadoras de esporos, do tipo bastonete, que fermentam lactose formando gás em um período de 24 a 48 horas após serem incubadas a 35°C (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Este grupo é formado por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, onde os gêneros predominantes são o *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

As bactérias que continuam a fermentar a lactose com produção de gás, quando incubadas à temperatura de 44,5 – 45,5°C por 24-48 horas, correspondem a um subgrupo de coliformes totais, os coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais. *Escherichia coli*, é o coliforme termotolerante com maior predominância, seu habitat primário é o trato intestinal do homem e animais de sangue quente, logo um indicador de contaminação fecal (SILVA et al., 2010).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, unidos em forma que lembram um cacho de uva. Pertencem à família *Micrococcaceae*, são anaeróbios facultativos, crescem melhor sob condições aeróbicas e são produtores de catalase. *Staphylococcus aureus* se diferenciam de outras espécies de *Staphylococcus* por produzirem grandes quantidades de coagulase e, assim, apresentam resultados da prova de coagulase fortemente positivos. São beta-hemolíticos, maltose e manitol positivos e produtores de enterotoxinas altamente

resistentes (FRANCO; LANDGRAF, 2002; SILVA et al., 2010).

S. aureus é um dos principais microrganismos patogênicos responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, muito difundido na natureza, seus principais reservatórios são os animais e os homens, nestes encontra-se presente principalmente nas mucosas e na pele. Por essa razão, os manipuladores de alimentos são a fonte mais frequente de contaminação, apesar dos equipamentos, utensílios e superfícies também poderem contaminar os alimentos (VARGAS et al., 2009). Os manipuladores de alimentos, portadores nasais de *Staphylococcus aureus*, desempenham um importante papel na transmissão do microrganismo através dos alimentos por eles manuseados (FRANCO; LANDGRAF, 2002; FEITOSA et al., 2017).

Uma das doenças transmitidas por alimentos (DTA) mais comuns é a intoxicação alimentar por estafilococos, a qual resulta do consumo de alimentos com enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas (DENAYER et al., 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 60% dos casos de doenças de origem alimentar decorrem do descaso higiênico-sanitário de manipuladores, da falta de higienização da estrutura física, utensílios e equipamentos e de técnicas ineficazes de processamento (OMS, 2010).

Salmonella é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo bacilos Gram-negativos não esporogênicos, oxidase negativos, catalase negativos e anaeróbios facultativos, produzem gás a partir da glicose, o citrato é sua única fonte de carbono, são muito difundidos na natureza, sendo os animais e os homens seus principais reservatórios naturais (FRANCO; LANDGRAF, 2002; VARGAS et al., 2009; SILVA et al., 2010).

A frequência de *Salmonella* spp. em alimentos, demonstra que o mesmo é inadequado para o consumo humano, pois a RDC nº 12 de 2001 determina a ausência de *Salmonella* em 25 g de alimento. *Salmonella* é o principal patógeno causador de doenças de origem alimentar em vários países, pois sua eliminação nas fezes é responsável pela contaminação de solos e águas, contaminando frutas e hortaliças, carnes cruas e produtos cárneos como os salames, os quais podem iniciar surtos de salmoneloses quando contaminados (BRASIL, 2001; ARALDI et al., 2016; SILVA et al., 2016).

1.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A pressão seletiva exercida pelo uso de drogas antimicrobianas e o uso irracional de antimicrobianos são os principais fatores por trás do surgimento e disseminação da resistência a drogas entre bactérias patogênicas e comensais (IYER et al., 2013). A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos é uma apreensão para as autoridades de saúde pública em todo o mundo.

A preocupação com a presença de isolados bacterianos resistentes a antimicrobianos em alimentos tem sido crescente. Frequentemente bactérias provenientes de alimentos de origem animal expressam resistência a inúmeros agentes antimicrobianos utilizados pelo homem no tratamento de certas infecções. (OLIVEIRA, 2007; BERNARDO, 2016). Segundo Slama et al. (2010) bactérias resistentes a antimicrobianos presentes em alimentos de origem animal, podem proporcionar a troca dos elementos genéticos codificadores (integrons, transposons e plasmídeos) de resistência a antimicrobianos, o que favorece a propagação dos genes de resistência entre as bactérias (OLIVEIRA, 2007).

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento animal foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) durante a década de 50, os quais eram aplicados na alimentação animal sem a necessidade de prescrição, o que, com o passar do tempo levou a utilização indiscriminada (GONZALES; MELLO; CAFÉ, 2012).

Quando utilizados de forma abusiva como promotores de crescimento na alimentação animal, os antimicrobianos, podem exercer forte pressão seletiva sobre patógenos e a microbiota saprofítica, contribuindo para o surgimento de multirresistência (FRANCO et al., 2010).

De acordo com Gonzales, Mello e Café (2012) devido a uma rígida legislação implantada por organismos reguladores internacionais e da constatação de que alguns produtos poderiam contribuir para o aparecimento de resistências ou reações de hipersensibilidade em humanos, atualmente são poucos os antibióticos utilizados em rações de animais aprovados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no Brasil.

Atualmente a secretaria de defesa agropecuária publicou a portaria nº 171 de 13 de dezembro de 2018 informando sobre a intensão de proibição de uso de alguns

antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de animais (BRASIL, 2018).

Quanto aos microrganismos, tem-se constatado que muitos isolados de *Staphylococcus* podem carregar genes de resistência a antimicrobianos, o que pode causar um quadro de infecção mais grave e de difícil tratamento (VITOLA et al., 2018).

A enumeração de *S. aureus* é uma das técnicas mais frequentemente realizadas no controle de qualidade de produtos cárneos, propiciando a formação de uma coleção de isolados, as quais podem ser utilizadas no monitoramento do surgimento de multirresistência (KUCHENBECKER; RIBEIRO; CARDOSO, 2009).

Verifica-se que há um crescimento significativo de *E. coli* de origem alimentar, contendo genes de resistência transferidos horizontalmente e surgimento de novos genes de resistência. Assim, reduzir o risco de resistência antimicrobiana no reservatório animal é muito importante (AARESTRUP, 2015). De acordo com Costa et al. (2010) com a redução do uso de promotores de crescimento em animais, pode-se minimizar a disseminação de *E. coli* resistente tanto para o ambiente como para o homem.

De acordo com Quesada et al. (2016) é raro ocorrer a transmissão de *Salmonella* spp. de pessoa para pessoa, portanto, considera-se que a principal fonte de exposição humana sejam os alimentos e estima-se que 95% das infecções estejam associadas a alimentos de origem animal. O surgimento de *Salmonella* multirresistente é um grave problema de saúde pública e apresenta sérias limitações nas possibilidades de tratamento efetivo de infecções humanas (INFOSAN, 2005; RESENDE 2015).

Nesta perspectiva, verifica-se a importância do presente estudo, pois os padrões higiênicos-sanitários satisfatórios na alimentação são uma das condições essenciais para a manutenção e promoção da saúde. Além disso, o uso cauteloso de agentes antimicrobianos se faz necessário, pois está associado a resistência bacteriana, a qual é um fenômeno crescente com implicações sociais e econômicas para a saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O estudo teve como objetivo avaliar a qualidade físico-química e microbiológica de embutidos cárneos fermentados produzidos no município de Francisco Beltrão-PR, bem como o perfil de resistência das bactérias isoladas desses produtos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar as características físico-químicas dos embutidos cárneos fermentados produzidos e comercializados no município de Francisco Beltrão;

Comparar as amostras de embutidos cárneos fermentados aos requisitos mínimos de qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento IN nº 22 de 2000 (BRASIL, 2000) e pela legislação específica do município Lei municipal nº 4411 de 2016;

Verificar a presença de microrganismos contaminantes nas amostras obtidas e comparar os resultados com a legislação que estabelece os Padrões Microbiológicos para alimentos (produtos cárneos maturados) estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 12 de 2001;

Analisar o perfil de resistência a antimicrobianos das bactérias patogênicas isoladas nas amostras de embutidos cárneos fermentado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

As amostras de embutidos cárneos fermentados foram adquiridas no segmento varejista, do município de Francisco Beltrão, em três coletas distribuídas entre março a novembro de 2018. Foram analisados os produtos processados por seis pequenas agroindústrias familiares, totalizando 18 amostras, as quais no momento de cada coleta estavam denominadas: uma como salame colonial, cinco como salame italiano e doze como linguiça colonial, oriundos do processo de produção artesanal que apresentavam embalagem individual com rotulagem geral, registrados pelo Serviço de Inspeção Municipal - SIM do município, as quais representam 100% das agroindústrias com registro no SIM.

No momento da coleta das amostras, observou-se o período de fabricação das mesmas a fim de que não houvesse variações significativas de tempo de produção. Com o objetivo de manter o sigilo das agroindústrias examinadas, as amostras foram codificadas representando-as por letras, sendo elas “A, B, C, D, E e F”.

As amostras foram acondicionadas em recipiente com isolamento térmico e encaminhadas aos Laboratórios de Bromatologia e Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus de Francisco Beltrão – PR, onde permaneceram sob refrigeração até o momento das análises físico-químicas e microbiológicas.

3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras foram homogeneizadas em multiprocessador de alimentos e em seguida, foram acondicionadas em frascos de vidro esterilizados, identificadas e mantidas em geladeira até a realização das análises.

As análises físico-químicas de umidade, pH, cinzas, proteínas e lipídeos foram realizadas conforme a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008) em triplicata.

3.2.1 Análise de pH

Foram pesadas 10g da amostra de salame colonial em um béquer e diluiu-se

com auxílio de 100 mL de água destilada. O conteúdo foi agitado até que as partículas ficassem uniformemente suspensas. O pH foi determinado em pHmetro digital da marca *pHmeter*, previamente calibrado.

3.2.2 Determinação de Umidade

A determinação deste parâmetro fundamenta-se na perda de umidade e substâncias voláteis a uma temperatura de 105°C.

Primeiramente os cadinhos foram levados ao forno mufla a 550°C por duas horas, em seguida foram transferidos para o dessecador até o resfriamento. Posteriormente, os cadinhos foram pesados vazios e após tarados foram pesados 5g de amostra de embutidos cárneos fermentados. Em seguida os cadinhos foram colocados em estufa à temperatura de 105 °C durante 3 horas, resfriou-se em dessecador e pesou-se. Este processo foi repetido de duas em duas horas, até peso constante. Após realizaram-se os cálculos de percentagem da umidade das amostras.

O cálculo da percentagem de umidade foi obtido pela seguinte equação:

$$(100 \times N) / P = \text{umidade ou substâncias voláteis a } 105 \text{ } ^\circ\text{C} (\%, \text{ m/m})$$

Onde: N: número de gramas de umidade (perda de massa em gramas);

P: número de gramas de amostra.

3.2.3 Determinação de Cinzas

O princípio do teste fundamenta-se na queima da matéria orgânica volátil a temperatura de 550°C e obtenção do resíduo mineral fixo.

Primeiramente os cadinhos foram aquecidos em forno mufla a 550°C por duas horas, seguido de resfriamento em dessecador e pesagem. Aproximadamente 5 a 10g de amostra de salame colonial foram pesadas e colocadas no cadinho de porcelana. Em seguida carbonizou-se as amostras de embutidos cárneos fermentados em chapa de aquecimento, evitando o superaquecimento e a formação de chama, e incinerou-se em mufla a 550°C até a eliminação completa do carvão (cinzas brancas ou ligeiramente acinzentadas), por aproximadamente 4 horas. Posteriormente resfriou-se em dessecador e pesou-se. Por fim, realizou-se os cálculos para determinar-se o percentual de cinzas nas amostras, levando-se em consideração o valor do cadinho inicial e final.

O cálculo da percentagem de cinzas foi obtido pela seguinte equação:

$$(100 \times N)/P = \text{cinzas (\%, m/m)}$$

Onde:

N: número de gramas de cinzas;

P: número de gramas de amostra.

3.2.4 Determinação de Proteínas

A determinação de proteína foi realizada pelo método de *Kjeldahl*, o qual baseia-se na determinação de nitrogênio através de três etapas: digestão, destilação e titulação (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

Foram pesados aproximadamente 0,2 g da amostra dos embutidos cárneos fermentados e transferidos para tubo de digestão. Na sequência foram adicionados 1g de mistura catalítica (sulfato de sódio + sulfato de cobre) e 3 mL de ácido sulfúrico P.A. Em seguida colocou-se os tubos com as amostras no bloco digestor, na capela, elevando gradativamente a temperatura até 350°C. Quando a solução se tornou azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos) a mesma foi aquecida por mais uma hora. Deixou-se esfriar. Após adicionou-se cerca de 10mL de água destilada ao tubo de digestão e o ligou imediatamente ao conjunto de destilação. Posteriormente, colocou-se 10mL de ácido bórico 2% com 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol) em um Erlenmeyer de 250mL, posicionando o Erlenmeyer no bico do condensador. Adicionou-se ao frasco que continha a amostra digerida, por meio de um funil com torneira, 20 mL de solução de hidróxido de sódio a 40% até garantir um ligeiro excesso de base. Aqueceu-se à ebulição e destilou-se até obter cerca de 50 mL do destilado. Por fim, titulou-se o excesso de (ácido bórico 2% + destilado) com solução de ácido clorídrico 0,1 M, até a solução mudar a coloração de verde para rósea.

O cálculo da percentagem de proteínas foi obtido pela seguinte equação:

Utilizado ácido clorídrico:

$$\text{Proteína total (\%)} = \frac{V \times f \times 0,0014 \times 6,25 \times 100}{P(g)}$$

$$\text{Proteína total (\%)} = \frac{V \times f \times 0,008755 \times 100}{P(g)}$$

Onde:

V = volume gasto de HCl 0,1M

f = fator do HCl 0,1M

0,0014 = miliequivalente grama do nitrogênio

6,25 = fator de conversão geral do nitrogênio em proteína

P = peso da amostra

3.2.5 Determinação de Lipídeos

A determinação de lipídios foi realizada utilizando o método de Soxhlet, por meio da extração por solventes, seguida da remoção por evaporação.

Primeiramente, os balões foram levados a estufa a 105°C por duas horas, resfriados em dessecador e pesados. Em seguida foram pesados aproximadamente 3g de amostra de salame colonial em papel filtro e fechado cuidadosamente. Transferiu-se o papel filtro com a amostra para o balão. Acoplou-se o extrator ao balão de fundo chato. Na sequência adicionou-se éter de petróleo em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Manteve-se a amostra em aquecimento, à extração contínua por cerca de 8 horas. Retirou-se o papel filtro com a amostra de salame colonial e destilou-se o éter restante, transferindo o balão com o resíduo extraído para uma estufa a 105°C. Resfriou-se em dessecador e pesou-se. Repetiu-se a operação de aquecimento por 30 minutos e resfriamento até peso constante.

O cálculo do índice de extrato seco etéreo foi obtido pela seguinte equação:

$$(100 \times N)/P = \text{extrato seco etéreo}$$

Onde: N: número de gramas de lipídeos;

P: número de gramas de amostra;

Os resultados foram analisados estatisticamente através de cálculo de média, desvio padrão, e teste de *Tukey* com significância ao nível de 5% ($p < 0,05$) utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

3.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Amostras de embutidos cárneos fermentados produzidos e comercializados no município de Francisco Beltrão - Paraná foram submetidas as seguintes análises: Determinação de coliformes totais, determinação de coliformes termotolerantes (45°C), pesquisa de *Escherichia coli*, pesquisa de *Salmonella spp.*, contagem de

Staphylococcus spp. e pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva, segundo Brasil (2003).

As análises foram realizadas segundo as metodologias preconizadas por Silva et al. (2010) em duplicata.

3.3.1 Preparo das amostras

Alíquotas de 25g de cada amostra do salame colonial a ser analisado foram pesadas assepticamente e homogeneizadas manualmente durante 1 minuto com 225 mL de água peptonada tamponada 0,1%, correspondendo à diluição 10^{-1} . Diluições decimais, a partir da diluição 10^{-1} , foram preparadas em tubos contendo 9 mL de água peptonada até a diluição 10^{-3} .

3.3.2 Determinação de coliformes totais

As pesquisas de coliformes totais foram feitas utilizando-se o método do Número Mais Provável (NMP), adotando-se a técnica dos tubos múltiplos, com utilização de três séries de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose - CLST e tubos de Durhan invertidos. Os tubos foram inoculados, transferindo-se 1 mL das diluições 10^{-1} a 10^{-3} para cada uma das séries, seguidos de incubação em estufa bacteriológica a 35°C, durante 48 horas e observação da produção ou não de gás.

Dos tubos de Durhan presuntivamente positivos, com turvação e produção de gás, transferiu-se por meio de uma alça de platina, uma alçada para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile 2% (CVB) nas mesmas condições de tempo e temperatura. O NMP de coliformes totais por grama de alimento foi determinado com base na tabela utilizada para o cálculo dos coliformes.

3.3.3 Determinação de coliformes termotolerantes

Dos tubos positivos, com produção de gás do CLST, transferiu por meio de alça de platina, uma alçada para tubos contendo Caldo EC (*Escherichia coli*), seguido de incubação em banho-maria, 44,5 - 45,5°C por 24 a 48 horas e observou-se crescimento (turvação) e produção de gás. O NMP de coliformes termotolerantes por grama de alimento foi determinado com base na tabela utilizada para o cálculo dos

coliformes.

3.3.4 Confirmação de *Escherichia coli*

De cada tubo positivo no caldo EC, estriou-se uma alçada em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), incubou-se a 35° C por 24 horas e observou-se o crescimento de colônias típicas de *E. coli*. A partir das colônias típicas de *E. coli* foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: Prova do Citrato de Simmons, Prova do Vermelho de Metila (VM), Prova do Voges-Proskauer (VP), indol e coloração diferencial de Gram (SILVA et al., 2010).

3.3.5 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Alíquotas de 25 g amostras de alimentos foram transferidas, assepticamente, para frascos contendo 225 mL de água peptonada tamponada para realização do pré-enriquecimento. Os frascos foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C. Alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL do enriquecimento não seletivo foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de caldo Tetrionato Muller Kauffmann (MKTT) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV). O caldo MKTT foi incubado a 37°C por 24 horas e o caldo RV a 42°C por 24 horas. Após o crescimento em caldo MKTT e em caldo RV foram realizadas estrias nos meios Ágar Hektoen entérico e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio (XLD) os quais foram utilizados como meios sólidos seletivos e diferenciais e incubados a 37°C por 24 horas. Colônias características de *Salmonella* foram submetidas à triagem bioquímica utilizando-se: Prova Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI), Prova do Voges-Proskauer (VP), Prova de descarboxilação da Lisina, indol e coloração diferencial de Gram (SILVA et al., 2010).

3.3.6 Contagem de *Staphylococcus* spp. e pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para a quantificação de *Staphylococcus* spp. utilizou-se o método de contagem “Spread-plate” em Ágar Baird Parker (BP), em duplicata depositando-se 0,1 mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas invertidas, em estufa, a 37°C, por 24 a 48 horas. Foram selecionadas as placas

contendo entre 20 e 200 colônias para contagem. Colônias características de *Staphylococcus* spp. foram submetidas às provas bioquímicas de catalase e coloração diferencial de Gram. Também foram selecionadas três colônias típicas de cada placa e inoculadas em tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), os quais foram incubados a 37°C por 24 horas. A partir do subcultivo crescido em BHI, realizou-se a prova de coagulase em tubo.

3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS (TSA)

A partir de testes bioquímicos prévios, 25 isolados contendo estirpes de *E. coli* (n=7), *S. aureus* (n=7) e *Salmonella* (n=11) foram selecionados para a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em ágar, segundo recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2005). Foram preparadas suspensões recentes das bactérias isoladas das amostras pesquisadas. Suspendeu-se colônias em solução salina estéril 0,85% até obter-se uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala de MacFarland (1×10^6 UFC/ml). Cada suspensão foi inoculada com o auxílio de um *swab* na superfície de placas contendo Ágar Mueller Hinton (MH). Após a secagem da superfície do ágar adicionou-se assepticamente com o auxílio de uma pinça os discos de papel impregnados com antimicrobianos. As placas com os antimicrobianos foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 18 a 24 horas. Após esse período com auxílio de uma régua foram medidos os diâmetros dos halos inibitórios de cada disco.

Foram utilizados os seguintes discos impregnados de antimicrobianos para testar os isolados de *Salmonella* e *Escherichia coli*: Ampicilina (10 µg), amicacina (30 µg), amoxicilina + clavulanato (20/10 µg), ceftazidima (30 µg), cefalotina (30 µg), cefepime (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefuroxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), sulfazotrim (23,75/1,25 µg). E os seguintes discos impregnados de antimicrobianos para testar os isolados de *S. aureus*: Cefepime (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), Clindamicina (2 µg), Eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), oxacilina (1 µg), penicilina-G (10 un), rifampicina (5 µg), sulfazotrim (23,75/1,25 µg) tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg).

Foram utilizadas como controle de qualidade cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A leitura e a interpretação dos

resultados foram realizadas de acordo com os padrões do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2005).

4. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, Frank. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.370, n. 1670, 2015.

ARALDI, Edimar *et al.* Estudo das condições microbiológicas e teores de nitrito em salames produzidos no alto Vale Do Rio Do Peixe – Santa Catarina, Brasil. **Revista Evidência**, v. 16, n. 2, p. 131-146, 2016.

BENEVIDES, Selene Dahia; NASSU, Renata Tiek. Produtos Cárneos. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. In: **Comunicado Técnico**. 2017. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/ovinos_de_corte/arvore/CONT000g3izo_hks02wx5ok0tf2hbweqanedo.html. Acesso em: 10 de outubro de 2017.

BERGAMINI, Alzira Maria Morato *et al.* Investigação laboratorial de surto de toxiinfecção alimentar. **Boletim Instituto Adolfo Lutz**. v. 25, n. 1, p. 4-6, 2015.

BERNARDO, Larissa Gomes. **Staphylococcus aureus** isolados de linguiças suínas e de frango do tipo frescal: perfil de suscetibilidade e caracterização molecular. 2016. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde). Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto 2244/1997**. Altera dispositivos do Decreto 30,691/1952, que aprovou o regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União. Brasília, 05 jun. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000**. Anexo V. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame. Anexo XIV. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça Colonial. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 3 ago. 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, **Resolução nº 12 de 2 de janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília 2 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do abastecimento. **Instrução Normativa nº 55 de 07 de julho de 2003**. Altera o subitem nº 4.2.2, dos anexos V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII, da Instrução Normativa nº 22, de 31 de junho de 2000, referente aos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Salames. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 8 jul. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da

República Federativa do Brasil, Brasília, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 171, de 13 de dezembro de 2018**. Informa sobre a intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 19 dez. 2018.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CACCIOPPOLI, Julieta *et al.* Aminas bioativas e características físico-química de salame tipo italiano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58 n.4, p.648-657, 2006.

CAMPAGNOL, Paulo Cezar Bastianello. **Cultura Starter produzida em meio de cultura de plasma suíno e antioxidante natural na elaboração do salame**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

CASARIL, Kérley Braga Pereira Bento *et al.* Qualidade microbiológica de salames e queijos coloniais produzidos e comercializados na região sudoeste do paraná. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.7, n.2, p.75-85, 2017.

COSTA, M. M. *et al.* Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.30-36, 2010.

DALLA SANTA, Osmar Roberto. **Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas starter para a produção de salame tipo italiano**. 2008. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

DENAYER, S. *et al.* Food-Borne Outbreak Investigation and Molecular Typing: High Diversity of Staphylococcus aureus Strains and Importance of Toxin Detection. **Toxins**, v.9, n. 12, 2017.

DORIGON, Clovis; RENK, Arlene. Técnicas e métodos tradicionais de processamento de produtos coloniais: de “miudezas de colonos pobres” aos mercados de qualidade diferenciada. **Revista de Economia Agrícola**, v.58, n.1, p. 101-113, jan./jun. 2011.

ERTURKMEN, P.; KILIÇ, G.B.; KILIÇ, B. Utilization of Lactic Acid Bacteria and Probiotics on Meat Products. **Journal of Hygienic Engineering and Design**. p. 78-82. 2016. Disponível em:

[file:///D:/Nova%20pasta%20\(6\)/UTILIZACIONOFLACTICACIDBACTERIAANDPROBIOTICSONMEATPRODUCTS%20\(2\).pdf](file:///D:/Nova%20pasta%20(6)/UTILIZACIONOFLACTICACIDBACTERIAANDPROBIOTICSONMEATPRODUCTS%20(2).pdf). Acesso em: fevereiro de 2018.

FEITOSA, Amanda Campos *et al.* *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Desafios**. v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do processamento de alimentos**. 2 ed. Tradução Florência Cladera Oliveira. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FIEIRA, Claudia. **Interferência de diferentes sais sobre a cultura starter de salame tipo italiano**. 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2014.

FRANCISCO BELTRÃO. **Lei Municipal nº 4.411**, de 5 de julho de 2016. Estabelece novas regras do Serviço de Inspeção Municipal (SIM) de Francisco Beltrão. Diário oficial dos Municípios do Sudoeste do Paraná. 07 jul 2016.

FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Mello; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002. 182p.

FRANCO, Robson Maia *et al.* Resistência Antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos Suínos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

GARCIA, F.T; GAGLEAZZI, U. A.; SOBRAL, P.J.A. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 151-158, 2000.

GEISEN, R.; LÜCKE, F. K.; KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and products. **Fleischwirtschaft**, Frankfurt, v.72, p.894–898, 1992.

GEORGES, Samira Obeid. **Qualidade microbiológica de linguças do tipo frescal e caracterização de isolados de *Escherichia coli***. 2015. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde), Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

GONZALES, Elizabeth; MELLO, Heloisa Helena de Carvalho; CAFÉ, Marcos Barcellos. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, Goiás, ano XII, nº 13, p. 48-53. 2012.

GOTTARDO, Elisângela Thaisa *et al.* Embutidos cárneos fermentados artesanais como veículos de microrganismos patogênicos de importância para a saúde pública. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 97-102, jan./jun. 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, 4 ed. 1º edição digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p.1020.

INFOSAN. Rede internacional de autoridades de segurança alimentar. 2005. **Resistência antimicrobiana à *Salmonella***. Organização Mundial de Saúde. Acesso em: 05 de janeiro de 2019. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_03_Salmonella_Apr05_en.pdf

f.

IYER, Archana *et al.* Transposable elements in *Escherichia coli* antimicrobial resistance. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 415-423, 2013.

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

JESSEN, B. **Starter cultures for meat fermentations**. In: CAMPBELL-PLATT, G.; COOK, P. E.; (Org.). *Fermented meats*. London: Blackie Academic Professional, 1995. p. 130-159.

KAIPERS, Kelen Fabiana Cavalli. **Efeito do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) como antioxidante em linguiça colonial**. 2017. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

KLEIN, Catia Silene *et al.* Qualidade microbiológica de salames tipo colonial comercializados na cidade de Concórdia-SC: análise de *Staphylococcus aureus* e *Toxoplasma gondii*. Embrapa Suínos e Aves. In: **Comunicado Técnico**, 446, 2006.

KUCHENBECKER, B. S.; RIBEIRO, A. R.; CARDOSO, M. Resistance profile of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal derived foods analyzed by the Brazilian Federal Inspection Service. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37, n. 2, p. 143-149. 2009.

LIMA Ítalo Abreu. **Produtos cárneos curados e dessecados da carne ovina adicionados de ingredientes funcionais**. 2016. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

MACEDO, Renata Ernlund Freitas de. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. 2005. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MACEDO, Renata Ernlund Freitas de *et al.* Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p.509-519, 2008.

MAGNANI, Ana Lúcia. **Efeito do cravo (*Syzygium aromaticum*) sobre *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em salame tipo italiano**. 2001. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

MAGRO, Graciele Regina; KLEIN, Catia Silene. Qualidade microbiológica de salames tipo colonial comercializados na cidade de Concórdia-SC: análise de *Salmonella*, coliformes totais e termotolerantes. Concórdia, SC: Embrapa Suínos e Aves. In: **Comunicado Técnico**, 449, 2006.

MARCO, Aurora; NAVARRO José Luis; FLORES Monica. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of slow dry fermented sausage. **Meat Science**, v. 73, p. 660-673, 2006.

MORCELI, Lilian. **Utilização de bioprotetores na elaboração de embutidos fermentados**. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

CLSI, Clinical and laboratory standards institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 8th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005. 58p.

OLIVEIRA, Keily Alves de Moura; MENDONÇA, Regina Célia Santos. Efeito da fermentação sobre a microbiota de embutidos cárneos. **Higiene Alimentar**, v.18, n.123, p.12-17, 2004.

OLIVEIRA, Rodrigo Coelho de. **Resistência a oxacilina e vancomicina em *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase negativos de diferentes origens**. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2007.

OMS. **Organização Mundial de Saúde**. Foodborne disease. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em 05/07/2018.

PERLIN, Gustavo Olivo *et al.* Prevalence of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*. Built-in meat recorded in municipal inspection service – yes and analyzed in 2012 by the central laboratory of the State of Paraná. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.9, n.1, p.43-49, 2015.

QUESADA, Adriana *et al.* Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**. v. 33, n. 1, p. 32-44, 2016.

RESENDE, Adilson Ribeiro. Fatores de patogenicidade e estudo epidemiológico de *Salmonella* minnesota de origem avícola. 2015. (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2015.

RITTER, Sidinei Roberto *et al.* Microbiologia contaminante e patogênica de linguiça (salame) colonial, analisada em quatro períodos distintos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.113, p.60-66, 2003.

SANTOS, Tiago Moreira dos. Resistência de microrganismos patógenos (*Clostridium*, *Salmonella* e *Listeria*) em embutidos crus e cozidos e carnes armazenadas em embalagem com atmosfera modificada. **PUBVET**, v.2, n.24, 2008.

SANTURIO, Deise Flores *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.1051-1056, 2011.

SARAIVA, Margarida *et al.* Investigação laboratorial de surtos de toxinfecção alimentar. **Instituto Nacional de Saúde**, Lisboa, n. 21, p. 24-28, 2016.

SILVA, Jaqueline Gonçalves da *et al.* Avaliação Microbiológica de Salames Industrializados e Artesanais Comercializados na Cidade de Alfenas – MG. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.30, n.254/255, p. 74 – 78. 2016.

SILVA, Neusely da *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela. 2010. 624p.

SLAMA, Ben K. *et al.* Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 282-286, 2010.

SIMÕES, Márcia Regina *et al.* Análise físico-química de linguças coloniais comercializadas no município de Toledo, Estado do Paraná e comparação com valores fornecidos pelos fabricantes. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 31, n. 2, p. 221-224, 2009.

SIPP, Maristela Dambros. **Características físico-químicas e qualidade microbiológica de linguça colonial produzidas e comercializadas na região do sudoeste do Paraná**. 2015. Monografia (Especialização em Gestão da Qualidade na Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Francisco Beltrão, 2015.

TEIXEIRA, Edson Borba. **Qualidade microbiológica e padrões físico-Químicos de Salame Colonial na Região de Criciúma/SC**. 2013. Monografia (Especialização em Controle de Qualidade de Carnes, Leite e Ovos), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

TERRA, A. B. M.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. **Particularidades na fabricação de salame**. São Paulo: Varela, 2004. 152 p.

THOMÉ, Bruna *et al.* Avaliação físico-química e microbiológica de salame tipo italiano, p. 4940-4947. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, XX, 2014, Florianópolis. **Anais[...]**. Florianópolis, v. 1, n. 2. 2014.

TOLLEFSON L. Developing new regulatory approaches to antimicrobial safety. **Journal Veterinary medicine**. v. 51, p. 415-418. 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.

VARGAS, Bianca Lauguer *et al.* Análise microbiológica de salame tipo alemão vendido em feiras-livres. **Higiene Alimentar**. v. 23, n.174/175, p. 105 – 109, 2009.

VITOLA, Helena Reissig Soares *et al.* Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango. **Brazilian Journal of Biosciences**. Porto Alegre, v. 16, n.1, p. 21-27.2018.

ZANETTE, Cristina Maria. **Efeitos da adição de cultura starter bacteriocinogênica produzida por *Lactobacillus plantarum* sobre *Listeria monocytogenes* em Linguça colonial**. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

5. ARTIGO CIENTÍFICO 01

Fermented Meat Sausages Produced in Francisco Beltrão – Paraná Town: Physicochemical and Microbiological Analysis and Bacterial Resistance Profile

Fermented Meat Sausages in Francisco Beltrão

Abstract: *Fermented meat sausages consumption in the Southwest region of Paraná, especially at Francisco Beltrão town, is highly appreciated, especially those known as sausage/ colonial salami. The research aimed at evaluating the physicochemical and microbiological quality of fermented meat sausages produced in Francisco Beltrão – PR town, as well as the resistance profile of the isolated bacteria from these products. For this purpose, 18 samples were submitted to the following microbiological analyzes: total coliforms count, thermotolerant coliform counts and Escherichia coli confirmation, Salmonella spp. research, Staphylococcus spp. count and coagulase positive Staphylococcus research, as well as pH physicochemical analyzes, moisture, ashes, proteins and lipids and bacterial resistance profile. Regarding to the microbiological parameters, 39% of the samples had total coliform counts $> 1.100 \text{ NMP.g}^{-1}$ and 28% presented counts of thermotolerant coliforms higher than allowed by the current legislation. Of the total samples analyzed, 39% presented contamination by E. coli and 61% por Salmonella spp. Coagulase positive Staphylococcus presence was confirmed in 39% of the samples analyzed. The results presented for the physicochemical parameters show that there was a significant difference ($p > 0.05$) among a large part of the samples evaluated, as well as for all parameters analyzed. It was obtained 25 isolated samples containing E. coli ($n = 7$), S. aureus ($n = 7$) and Salmonella ($n = 11$). From the total of isolated microorganisms, 16% did not present resistance to any of the antimicrobials tested, while the others (84%) presented resistance to at least one of the antimicrobials tested. It was observed that most of the samples of fermented meat sausages analyzed in this study are in disagreement with the Brazilian legislation in force regarding the microbiological parameters.*

Key-words: meat sausages, microbiological standard, physicochemical pattern, bacterial resistance.

INTRODUCTION

Meat is a very perishable food, because of the great amount of water present in its composition, so over time ancient forms of conservation and preservation, such as curing, drying, smoking and fermentation were researched by ancient civilizations, so the fermented meat sausages emerged as a meat preservation strategy¹.

Fermented meat sausages can be defined as a combination of meat, fat, salt, curing and seasoning portions, among other components, which are organized into wraps, fermented, dried and matured in chambers with controlled temperature and humidity. This type of food is important for promoting and preserving nutrients, besides presenting a wide diversity of flavors, smell and textures that enrich their sensorial characteristics².

Fermented meat sausages consumption is part of the food habits of a large part of the Brazilian population and has been showing significant growth. In the southwestern region of Paraná, in particular, at Francisco Beltrão town, the most consumed fermented meat dishes are the sausage / colonial salami, because they have simple processing technology and low price. Often the colonial-type salami terminology is used referring to colonial sausage, because there is no identity pattern that regulates the colonial-type salami product³.

It is understood by colonial sausage the industrialized meat product, elaborated exclusively from pork meats, added of bacon, ingredients, milled in variable granulometry, embedded in natural wrap, cured, that undergoes a fast process of fermentation, smoked and desiccated by time indicated by the manufacturing process⁴. Yet salami is the processed meat product obtained from pork or pork and bovine with added bacon and spices, later embedded in natural and/or artificial wraps, tanned, fermented, matured, smoked or not and dried⁴. What differentiates them basically is the type of meat used and the moisture percentage⁴. For Kaipers⁵ the colonial sausage has an advantage over the other sausages because it is available to the consumer in a short time after its production, as it does not require

maturation time for consumption.

The production of meat sausages involves several stages of manipulation, increasing the risk of contamination by microorganisms, pathogens or deteriorators, compromising the hygienic-sanitary quality of the food^{6,7}. As they are produced with raw meats, colonial sausages and salami require inspection to ensure food safety in relation to microbiological quality^{8,9,3}.

The quality of the meat sausages can be verified through physical-chemical and microbiological analyzes, which must be in accordance to the standards established by the Technical Regulation of Identity and Quality, Normative Instruction No. 22, from July 31st, 2000, which establishes the identity standards for the so-called "Colonial Sausage" and "Salame" products produced in Brazil⁴ and by the National Agency of Sanitary Surveillance – ANVISA, through Resolution RDC No. 12, from January 2nd, 2001, establishing the microbiological standards for foods. For mature meat sausages such as salami /colonial sausage, the maximum tolerated thermotolerant coliform/g is 10^3 UFC, coagulase positive *Staphylococcus*/g is 5×10^3 UFC and absence of *Salmonella* spp. in 25 g of sample⁶.

Microorganisms have a fundamental role when they refer to food, because some species when present in food can cause beneficial changes, modifying their original characteristics in a way to turn it into a new food. They can also cause so-called microbial deterioration of food by altering product characteristics like color, smell, taste, texture and appearance. Other micro-organisms species or their toxins when present in food can cause harm to human health¹⁰.

Many of these damages can be alleviated if the microorganisms are resistant to antimicrobials. Bacterial resistance to antimicrobials has become a serious public health problem. There is evidence that the indiscriminate antibiotic usage s in animals treatment or as a growth stimulant, make their products and derivatives, source for resistance to antibiotics used in humans^{11,12}.

In this perspective, the importance of the present study is verified, since the satisfactory hygienic-sanitary standards in the feeding are one of the essential conditions to the health maintenance and promotion. In addition, cautious on antimicrobial agents usage is necessary because it is associated to bacterial resistance, which is a growing phenomenon with social and economic implications for public health. Therefore, the study aimed to evaluate the physical-chemical and microbiological quality of fermented meat sausages produced in Francisco Beltrão – PR town, as well as the resistance profile of the bacteria isolated from these products.

MATERIALS AND METHODS

SAMPLING

Fermented meat sausage samples were purchased in the retail segment of Francisco Beltrão town, in three collections distributed among March and November of 2018. The products processed by six small family agroindustries were analyzed, totaling 18 samples denominated colonial salami (n = 1), Italian salami (n = 5) and colonial sausage (n = 12), originating from the artisanal production process that presented individual packaging with general labeling, registered by the Municipal Inspection Service – SIM of the town, which represent 100% of agro industries with SIM registration.

At the time of sampling, the period of manufacture of the samples was observed so that there were no significant variations in production time. In order to maintain the confidentiality of the agroindustries examined, the samples were codified representing letters, being "A, B, C, D, E and F".

The samples were conditioned in a thermal insulated container and sent to the Bromatology and Microbiology Laboratories from the Health Sciences Center of the Western Paraná State University – UNIOESTE, Francisco Beltrão – PR campus, where they remained under refrigeration until the physical-chemical and microbiological analysis.

PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS

The samples were homogenized in food multiprocessor until a uniform sample was formed and then they were placed in sterilized glass bottles, identified and kept in the refrigerator until the analyzes were carried out.

The physical-chemical analyzes of moisture (drying method at 105°C), pH, ash (muffle furnace at

550°C), proteins (Kjeldhal method) and lipids (Soxhlet method) were performed according to the methodology of the Instituto Adolfo Lutz¹³, in triplicate.

The results were statistically analyzed through the average calculation, standard deviation, analysis of variance and Tukey's test with significance at the 5% level ($p < 0.05$) using the Sisvar program¹⁴.

MICROBIOLOGICAL ANALYSIS

Fermented meat sausages samples produced and marketed in Francisco Beltrão – Paraná town were submitted to the following analyzes: total coliform count, thermotolerant coliform count (45 ° C), *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and coagulase positive *Staphylococcus*¹⁵ test. The analyzes were performed according to the methodologies recommended by Silva et al.¹⁶ in duplicate.

ANTIMICROBIAL SENSITIVITY TEST (TSA)

From the previous biochemical tests, 25 isolated samples containing *E. coli* strains ($n = 7$), *S. aureus* ($n = 7$) and *Salmonella* ($n = 11$) were selected for the antimicrobial susceptibility test using the diffusion in agar, according to recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁷. Recent suspensions of the bacteria isolated from the samples surveyed were prepared. Colonies were suspended in sterile 0.85% saline until a turbidity compatible with grade 0.5 of the MacFarland scale (1×10^6 UFC/ml) was achieved. Each suspension was inoculated with the aid of a swab on the surface of plates containing Mueller Hinton Agar (MH). After drying the agar surface, the paper disks impregnated with antimicrobials were added aseptically with the aid of a forceps. The antimicrobial plaques were incubated in a bacteriological oven at 36°C for 18 to 24 hours. After this period with the aid of a ruler, the diameters of the inhibitory halos of each disc were measured.

The following antimicrobial-impregnated disks were tested for *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated samples: Ampicillin (10 µg), amikacin (30 µg), amoxicillin + clavulanate (20/10 µg), ceftazidime (30 µg), cephalothin (30 µg), cefepime (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefuroxime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), meropenem (10 µg), sulfazotrim (23.75 µg / 1.25 µg). (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), Clindamycin (2 µg), Erythromycin (15 µg), gentamycin (10 µg), and the following antimicrobial-impregnated disks were tested for *S. aureus* isolates:), oxacillin (1 µg), penicillin-G (10 µm), rifampicin (5 µg), sulfazotrim (23.75 / 1.25 µg), tetracycline (30 µg) and vancomycin (30 µg).

Standard strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used as quality control. Reading and results interpretation were performed according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁷.

RESULTS AND DISCUSSION

When analyzing the information obtained on the fermented meat products labels produced and marketed in Francisco Beltrão, it was observed that there was disagreement regarding to the sales denomination of each product. The great majority ($n = 5$) was denominated Italian salami and a sample ($n = 1$) colonial salami. The inspection service of Francisco Beltrão town performs the inspection of the products in accordance to the Municipal Law No. 4411 from 2016¹⁸, which is based on IN No. 22 from 2000 and both do not recognize the terminology "Colonial Salami" as official.

After the first stage of analysis, changes were observed in the fermented meat sausages labels produced and marketed in Francisco Beltrão. A consultation was made to the Municipal Inspection Service (SIM) to provide an understanding of the reasons for the changes. The SIM informed that after inspection of all products, followed by physical-chemical analyzes, all agribusinesses began to denominate their products as colonial sausage and no longer as Colonial Salami and Salami.

Physicochemical Analysis

The results obtained for the physico-chemical parameters from the fermented meat product samples can be visualized in Table 1. For the potential hydrogenation parameter (pH), the samples presented averages that varied among 4.88 and 5.72 (Table 1) respectively. Sipp, Marchi and Tonial¹⁹ evaluated 15 colonial

sausage samples produced and marketed in the microregion of Itapejara do Oeste – PR town, found pH values ranging from 4.99 to 5.90, very similar to those observed in this study.

Table 1. Physicalchemical analyzes from fermented meat sausages samples produced Francisco Beltrão – PR town.

Samples	pH	Moisture	Ash	Proteins	Lipids
A	5,17±0,00 ^e	61,98±0,22 ^c	4,04±0,08 ^{def}	23,51±0,60 ^c	3,81±0,87 ^g
B	4,98±0,01 ^{gh}	62,70±0,59 ^{bc}	3,83±0,51 ^{efg}	23,32±1,11 ^{cd}	3,14±0,20 ^g
C	5,35±0,01 ^c	54,99±0,26 ^h	4,00±0,11 ^{defg}	21,28±0,34 ^{efg}	12,93±0,80 ^{bc}
D	5,01±0,01 ^g	63,82±0,26 ^a	3,18±0,01 ^{hi}	16,75±1,34 ^h	12,69±1,03 ^c
E	4,94±0,01 ^{hi}	50,24±0,17 ^j	4,44±0,02 ^{cd}	21,57±0,61 ^{def}	15,29±1,28 ^a
F	5,72±0,06 ^a	45,18±0,14 ^l	4,91±0,02 ^{bc}	20,30±0,80 ^{fg}	12,24±0,86 ^c
A1	5,00±0,01 ^g	57,00±0,19 ^g	3,63±0,02 ^{fgh}	23,20±0,22 ^{cd}	5,73±0,27 ^f
B1	4,87±0,01 ^k	56,04±0,41 ^g	4,79±0,48 ^{bc}	28,98±0,30 ^a	7,84±0,16 ^e
C1	5,26±0,01 ^d	51,00±0,55 ^j	4,90±0,03 ^{bc}	27,87±0,44 ^a	9,86±0,26 ^d
D1	5,42±0,01 ^b	59,12±0,15 ^e	5,49±0,03 ^a	20,83±0,33 ^{fg}	14,95±0,78 ^a
E1	4,88±0,01 ^{jk}	60,17±0,30 ^d	3,05±0,16 ⁱ	19,88±0,28 ^{fg}	12,68±0,46 ^c
F1	5,33±0,01 ^c	47,18±0,25 ^k	3,61±0,02 ^{fgh}	20,85±0,49 ^{fg}	12,04±0,31 ^c
A2	5,10±0,01 ^f	58,04±0,45 ^f	3,28±0,04 ^{hi}	22,71±0,28 ^{cde}	8,40±0,34 ^{de}
B2	4,92±0,01 ^{ij}	52,38±0,26 ⁱ	5,13±0,03 ^{ab}	23,83±0,32 ^c	13,08±0,27 ^{bc}
C2	5,34±0,01 ^c	56,91±0,36 ^g	3,83±0,02 ^{efg}	25,68±0,28 ^b	9,70±0,49 ^d
D2	5,27±0,01 ^d	64,09±0,30 ^a	4,16±0,03 ^{de}	21,31±0,61 ^{efg}	13,58±0,34 ^{abc}
E2	4,90±0,01 ^{ijk}	63,31±0,30 ^{ab}	3,50±0,03 ^{ghi}	19,53±0,46 ^g	14,74±0,10 ^{ab}
F2	5,71±0,01 ^a	43,58±0,23 ^m	4,50±0,02 ^{cd}	20,72±0,22 ^{fg}	12,58±0,31 ^c
GV	5,18	55,98	4,13	22,34	10,85
CV	0,30	0,58	4,16	2,62	5,59

Mean values followed by their standard deviation. Different letters in the same column indicate a significant difference between by Tukey's test ($p < 0.05$). (GV) = General Average. (CV%) = Coefficient of variation.

D'agostini, Campana and Degenhardt²⁰ when analyzing 6 samples of sausages produced in the lower Vale do Rio do Peixe, Santa Catarina, found pH values between 4,94 and 6,00. According to Lima²¹ the final pH will depend on a number of factors such as the amount of carbohydrates available, fermentation time, temperature, relative moisture during the process, the type of sugar used in the formulation and the fermentation technique.

The moisture contents from the fermented meat sausages evaluated ranged from 43.58% to 64.09% (Table 1). Kaipers⁵ analyzing 5 colonial sausage formulations with 30% sodium reduction developed in the canning industry located in Francisco Beltrão – PR town obtained moisture values ranging from 26.69% to 62.23% on different days of storage. Thomé et al.²² found in five brands called salami type Italian, moisture values ranging from 29.92% to 38.97%. In both studies, much lower moisture values were observed than in the present study.

The results of the fixed mineral residue parameter (ashes) from the fermented meat sausages samples found ranged from 3.05% to 5.49%. Sipp, Marchi and Tonial¹⁹ obtained similar results when analyzing 15 colonial sausage samples produced and marketed in the microregion of Itapejara do Oeste – PR town, whose ash values varied among 3.60% and 5.38%.

The protein contents for the analyzed samples ranged from 16.75% to 28.98% (Table 1). The Technical Regulation on the Identity and Quality of Salami⁴ determines for proteins a minimum quantity of 20%, while for colonial sausage the minimum protein value indicated in the legislation is 18%. Thus, it was observed that 94% protein content in accordance with the legislation, while 6% of the samples had a lower content than the recommended one. Similar results were obtained by Silva et al.⁹ when evaluating 5 samples of colonial Italian salamis produced in the western region of Paraná state, it was observed that the protein levels varied among 19.76% and 28.52%.

Regarding to the fat content, a variation among 3.14% and 15.29% was observed in the samples evaluated (Table 1), values that are below than those indicated by the legislation (maximum of 35% for salami and 30% for colonial sausages)⁴. Low fat contents were also observed by D'agostini, Campana and Degenhardt²⁰ when analyzing 6 sausages samples produced in the Vale do Rio do Peixe - Santa Catarina observed a variation among 12.02% and 23.50%. Kaipers⁵ when analyzing 5 colonial sausage formulations with 30% sodium reduction developed in the canning industry located in Francisco Beltrão

– PR obtained lipid values that varied among 19.76% and 25.63%, also below than that recommended by the current legislation.

The results presented in table 1 show that there was a significant difference ($p > 0.05$) among a large part of the samples evaluated, as well as for all analyzed parameters, which may indicate absence of standardization of the production process;

Microbiological Analyzes

From the fermented meat sausages ($n = 18$) samples analyzed, all (100%) had total coliform counts varying from 23 MPN.g⁻¹ to > 1.100 MPN.g⁻¹, of which seven samples (39%) presented total coliform count > 1.100 MPN.g⁻¹ (Table 2). Similar results were found by Sipp, Marchi, and Tonial¹⁹ when evaluating 15 samples of colonial sausages, commercialized in the microregion of Itapejara d'Oeste – PR town, which observed that 100% of the samples evaluated showed contamination by total coliforms; however, all counts were within the limits established by law. In a study carried out by Magro and Klein²³ when evaluating the microbiological quality of 20 colonial-type salami samples commercialized in Concórdia – SC city, they observed that 19 (95%) samples were contaminated by total coliforms, indicating a high contamination.

Samples of fermented meat sausages analyzed showed thermotolerant coliform counts varying among < 3,0 e > 1.100 MPN.g⁻¹. One sample (6%) had a thermotolerant coliform count of 1.100 MPN.g⁻¹ and 4 (22%) presented thermotolerant coliform counts > 1.100 MPN.g⁻¹ (Table 2), ie, unfit for human consumption, because the parameters established by Brazilian legislation⁶ for counting thermotolerants in mature products is at most $1,0 \times 10^3$ MPN.g⁻¹.

Table 2. Most probable number (MPN.g⁻¹) total coliforms, thermotolerant coliforms, and *E. coli* and *Salmonella* spp. research in samples of fermented meat sausages produced in Francisco Beltrão-PR town.

Samples	Total Coliforms (NMP.g ⁻¹)	Thermotolerant Coliforms (NMP.g ⁻¹)	<i>E. coli</i> Presence / Absence	<i>Salmonella</i> spp. Presence / Absence
A	>1.100	>1.100	Presence	Absence
B	>1.100	>1.100	Presence	Presence
C	>1.100	640	Absence	Absence
D	1.100	430	Absence	Presence
E	460	230	Absence	Absence
F	>1.100	>1.100	Presence	Presence
A1	>1.100	>1.100	Presence	Presence
B1	23	3,6	Presence	Presence
C1	23	<3,0	Absence	Absence
D1	210	<3,0	Absence	Presence
E1	460	75	Absence	Absence
F1	460	23	Absence	Absence
A2	>1.100	1.100	Presence	Presence
B2	460	460	Presence	Presence
C2	23	3,6	Absence	Presence
D2	460	11	Absence	Presence
E2	>1.100	150	Absence	Presence
F2	460	230	Absence	Absence

SOURCE: Research Data, 2018.

Similar results were obtained by Casaril et al.²⁴ when they found that of the 12 colonial salami samples analyzed, 2 (16.6%) had thermotolerant coliform counts above 1.100 NMP.g⁻¹, that is, more than allowed by the legislation. In a study carried out by Oliveira et al.²⁵ when evaluating 30 colonial salamis samples manufactured in different Southwest towns of Paraná state, three (10%) samples showed a thermotolerant coliform count higher than the allowed by the legislation.

Gottardo et al.²⁶ found that 18.3% of the 60 artisanal fermented meat sausages samples, commercialized in the retail of Cascavel, Palotina, Toledo and Marechal Cândido Rondon towns, in the western region of Paraná state, presented coliform counts at 45°C above the standard of Brazilian legislation.

Of the total samples analyzed in this study, 39% (seven) were contaminated by *E. coli* and 61% (eleven) by *Salmonella* spp. (Table 2). In a study carried out by Farth and Lima²⁷, when analyzing 11 colonial salamis samples marketed in open fairs at Toledo – PR city, the presence of *E. coli* was confirmed in 5 (45.45%) samples. Casaril et al.²⁴ when evaluating 12 colonial salami samples produced and marketed in the Southwest region of Paraná state, observed that 2 (16.6%) samples had a positive result for *Escherichia coli*.

Sipp; Marchi and Tonial¹⁹ when searching 15 colonial sausage samples produced and marketed in the microregion of Itapejara do Oeste – PR town verified that 100% of the samples did not indicate the presence of *Salmonella* spp., therefore, according to what the legislation indicates. Oliveira et al.²⁵ verified the presence of *Salmonella* spp. in 5 (16.6%) of the 30 analyzed samples of colonial salami produced in different towns in southwest of Paraná. There are no standards established by the Brazilian legislation to *E. coli* counting, but Resolution RDC No. 12 from January 2nd, 2001 establishes *Salmonella* spp. absence in 25 g of sample⁶.

Of the analyzed samples, 89% (n = 16) were contaminated by *Staphylococcus* spp. and the counts ranged from $<1,0 \times 10^1$ a $1,5 \times 10^6$ UFC. g⁻¹. The presence of coagulase positive *Staphylococcus* was confirmed in 39% (n = 7) (Table 3) of the analyzed samples, of which 71% (n = 5) presented a count above the maximum allowed by the current legislation and therefore considered unfit for human consumption.

Current Brazilian legislation does not establish standards for *Staphylococcus* spp. in fermented meat sausage, however, the maximum allowable limit for coagulase positive *Staphylococcus* counts is $5,0 \times 10^3$ UFC. g⁻¹⁽⁶⁾.

In a study carried out by Gottardo et al.²⁶ when analyzing 60 samples of artisanal fermented meat sausages, commercialized in the retail of Cascavel, Palotina, Toledo and Marechal Cândido Rondon towns, in the western region of Paraná state, they observed that 16.7% of samples confirmed the presence of coagulase positive *Staphylococcus*, which may indicate that the general conditions of hygiene and handling of these products were not satisfactory.

Table 3. *Staphylococcus* spp. and coagulase positive *Staphylococcus* research in samples of fermented meat sausages produced in Francisco Beltrão-PR town.

Products	<i>Staphylococcus</i> spp. (UFC. g ⁻¹)	Coagulase positive <i>Staphylococcus</i> (UFC. g ⁻¹)
A	0	Negative
B	$2,5 \times 10^2$	Positive
C	$8,7 \times 10^3$	Positive
D	$< 1,0 \times 10^1$	Negative
E	0	Negative
F	$< 1,0 \times 10^1$	Negative
A1	$3,0 \times 10^5$	Negative
B1	$3,8 \times 10^3$	Positive
C1	$1,2 \times 10^6$	Positive
D1	$1,1 \times 10^5$	Negative
E1	$4,0 \times 10^3$	Negative
F1	$< 1,0 \times 10^1$	Negative
A2	$3,3 \times 10^5$	Negative
B2	$8,0 \times 10^5$	Positive
C2	$1,5 \times 10^6$	Positive
D2	$1,3 \times 10^5$	Negative
E2	$8,7 \times 10^4$	Positive
F2	$< 1,0 \times 10^1$	Negative

SOURCE: Research Data, 2018. The antimicrobial susceptibility profiles of the 25 isolated bacterial strains are shown in Chart 1.

Of the total number of isolated microorganisms 4 (16%) did not present resistance to any of the antimicrobials tested, while the other 21 (84%) presented resistance to at least one of the antimicrobials tested. All isolates were sensitive to cefepime, ciprofloxacin and gentamicin (Chart 1).

The *Salmonella* isolated samples had the highest resistance indexes, 10 (91%) samples showed resistance to at least one antimicrobial type, resistance to six drugs, amoxicillin + clavulanate (45%), ampicillin (64%), cephalothin (45%), cefoxitin (55%), cefuroxime (9%), and sulfazotrim (36%). In a study carried out by Miranda²⁸, it was observed that from the total of the resistant strains, 33% of the

isolated food showed multiple resistance, revealing a significant problem for the public health. There are few studies about *Salmonella* spp. sensitivity profile in fermented meat sausage samples (salami and/or colonial sausages).

From the 7 isolated *Escherichia coli* samples, 4 (57%) were resistant to at least one antimicrobial tested, it was observed resistance to ampicillin 4 (100%), cephalothin 1 (14%) and sulfazotrim 2 (29%) while two strains presented intermediate results on cephalothin (29%). The results found in this work differ from those described by Melo²⁹, of which 36 isolated strains of *E. coli* from food, 23 (64%) were sensitive to all antimicrobials, 2 (5%) presented intermediate sensitivity and 11 (31%) showed resistance, the highest resistance pattern was tetracycline with 9 (82%) of the 11 resistant strains tested. Of the isolated *Staphylococcus aureus*, 100% of them presented resistance to at least one of the antimicrobials tested, it was observed resistance indices in only two antimicrobials, compared to sulfazotrim (71%) and tetracycline (29%). In a study carried out by Kuchenbecker, Ribeiro and Cardoso³⁰, in which evaluated 245 *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal products analyzed by the Brazilian Federal Inspection Service, most of the isolates (64.1%) presented resistance to at least one of the tested antimicrobials, agreeing to the observation that the presence of resistance genes in *S. aureus* is no longer a phenomenon restricted to the hospital environment.

Chart 1. Antimicrobial resistance profile tested in isolates of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and coagulase positive *Staphylococcus* from fermented meat sausage samples produced in Francisco Beltrão-Paraná town.

<i>Salmonella</i> spp.	AMP	AMI	CAZ	CFL	CPM	CFO	CRX	CIP	GEN	MER	SUT	AMC
Isolated 1	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Isolated 2	R	S	S	R	S	R	R	S	S	S	R	R
Isolated 3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Isolated 4	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R
Isolated 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Isolated 6	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R
Isolated 7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
I Isolated 8	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
Isolated 9	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Isolated 10	I	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	I
Isolated 11	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	AMP	AMI	CAZ	CFL	CPM	CFO	CRX	CIP	GEN	MER	SUT	AMC
Isolated 1	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Isolated 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Isolated 3	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Isolated 4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Isolated 5	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Isolated 6	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Isolated 7	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Coagulase positive <i>Staphylococcus</i>	CPM	CIP	CLO	CLI	ERI	GEN	OXA	PEN	RIF	SUT	TET	VAN
Isolated 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Isolated 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Isolated 3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
Isolated 4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Isolated 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Isolated 6	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
Isolated 7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S

R = Resistance; I = indeterminate; S = Sensitivity. AMC = amoxicillin + clavulanate; CAZ = ceftazidime; AMI = amikacin; AMP = ampicillin; SUT = sulfazotrim; GEN = gentamicin; CIP = ciprofloxacin; MER = meropenem; CPM = cefepime; CFL = cephalothin; CRX = cefuroxime; CFO = cefoxitin; NPV = vancomycin; RIF = rifampicin; TET = tetracycline; OXA = oxacillin; CLI = clindamycin; CLO = chloramphenicol; ERI = erythromycin; PEN = penicillin.

Although in fermented foods there is a low incidence of resistant isolates, it is important to highlight the possible risk of these microorganisms acting as reservoirs of antimicrobial resistance determinants with the possibility of transmission to human commensals and pathogens³¹.

CONCLUSIONS

The results of this research allow us to conclude that the analyzed samples show great variability in the physical-chemical parameters, which may indicate the absence of standardization of the production process. In relation to the microbiological parameters, most of the samples of fermented meat sausages analyzed in this study are in disagreement with the Brazilian legislation in force. The presence of thermotolerant coliforms and *E. coli* in food can be indicative of fecal contamination evidencing poor hygiene conditions in the handling and preparation of the same.

The most frequent microorganism in the samples was *Salmonella* spp. and their frequency in food, determines that it is unfit for human consumption. Samples contaminated with *S. aureus* were also observed, some with counts above that allowed by legislation.

In relation to the antimicrobial susceptibility test, most of the isolated microorganisms presented resistance to at least one antimicrobial tested and in some isolates of *Salmonella* spp. it was observed the presence of multiresistance which is a serious public health problem.

REFERENCES

- 1 LEROY F, GEYZEN A, JANSSENS M, DE VUYST L, SCHOLLIERS, P. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: a historical outlook. *Trends Food Sci. Technol.* 2013; 31: 130–137.
- 2 BERNARDI S, GOLINELI BB. Review: Aspects of the application of starter cultures in fermented meat sausage production. *Braz. J. Food. Technol.* 2010; 13 (2): 133-140.
- 3 DE RÉ A. Tradition x microbiological safety of salami colonial type of the municipality of Bento Gonçalves/RS. (Monografia). Porto Alegre: Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2014.
- 4 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 31 de julho de 2000. Anexo V. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Salame. Anexo XIV. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Linguiça Colonial. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 3 ago. 2000.
- 5 KAIPERS KFC. Effect of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) as antioxidant in colonial sausage. (Dissertação). Londrina: Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2017.
- 6 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução nº 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília 10 jan. 2001.
- 7 ARALDI EZ, MOREIRA J, MAZUREK L, ARALDI LZ, ARIOTTI AP, SOARES FASM. Study of microbiological conditions and nitrite content in salami produced at the region of Alto Vale do Rio do Peixe – Santa Catarina, Brazil. *Evidência.* 2016; 16(2): 131-146.
- 8 SIMÕES MR, COSTA TA, SOUZA ML, HOLZBACH JC, CARNEIRO LB, GUBIANI AM. Physical-chemical analysis of colonial sausage commercialized in Toledo, Paraná State and comparison with values provided by manufacturers. *Acta Sci. Technol.* 2009; 31(2): 221-224.
- 9 SILVA C, SAVARIZ FC, FOLLMANN HM, NUÑEZ L, CHAPLA VM, SILVA CF. Physical-chemical analysis of colonial Italian type salami commercialized in Toledo, Paraná state. *Acta Sci. Technol.* 2011; 33(3): 331-336.
- 10 FRANCO BDGM, LANDGRAF M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo, Atheneu; 2002. 182 p.
- 11 MOTA RA, SILVA KPC, FREITAS MFL, PORTO WJN, SILVA LBG. The abuse of antimicrobials drugs and the appearance of resistance. *Braz J Vet Resanim Sci.* 2005; 42 (6): 465-470.
- 12 CERQUEIRA ES, ALMEIDA RCC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin: A systematic review. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2013; 72(4): 268-81.
- 13 ZENEBO O, PASUET NS, TIGLEA P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz; 2008. 1020 p.

- 14 FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- 15 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 18 set. 2003.
- 16 SILVA N, JUNQUEIRA VCA, SILVEIRA NFA, TANIWAKI MH, SANTOS RFS, GOMES RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4 ed. São Paulo, Varela; 2010. 624p.
- 17 CLSI, Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005. 58p.
- 18 FRANCISCO BELTRÃO. Lei Municipal nº 4.411, de 5 de julho de 2016. Estabelece novas regras do Serviço de Inspeção Municipal de Francisco Beltrão (SIM). *Diário oficial dos Municípios do Sudoeste do Paraná*. 07 jul 2016.
- 19 SIPP MD, MARCHI JF, TONIAL IB. Chemical, Physicochemical characteristics and microbiological quality of colonial salami produced and commercialized in the micro region of Itapejarad'Oeste – PR. *Braz J of Food Research*. 2017; 8(1): 142-155.
- 20 D'AGOSTINI FP, CAMPANA P, DEGENHARDT R. Quality and identity of fermented Salami-type Sausages produced in the low Vale of Rio do Peixe, Santa Catarina-Brazil. E-tech: *Tecnol. Comp. Industrial*. 2009; 2(2): 1-13.
- 21 LIMA IA. Preparation and characterization of lamb Saint Inês salame. (Dissertação). Itapetininga. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2009.
- 22 THOMÉ BR, PEREIRA MG, TOGNON FAB, MASSAROLLO MD, FOLADOR FAC. Physico-chemical and microbiological evaluation of Italian type salami. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química-COBEQ. 19 a 22 de outubro de 2014; Florianópolis; Santa Catarina.
- 23 MAGRO GR, KLEIN CS. Microbiological quality of colonial-type salami marketed in the city of Concórdia-SC: analysis of Salmonella, total coliforms and thermotolerant. Embrapa Suínos e Aves. In: Comunicado Técnico. Concórdia, Santa Catarina. 2006.
- 24 CASARIL KBPB, BENTO CBP, HENNING K, PEREIRA M, DIAS VA. Microbiological quality of salami and cheeses colonial produced and marketed in the southwest of Paraná. *Rev. Bras. Agropecu. Sustent*. 2017; 7(2): 75-85.
- 25 OLIVEIRA DF, BRAGHINI F, SILVEIRA JÚNIOR JFS, COELHO AR, TONIAL IB. Conditions sanitary and nutritional quality of handmad salami and industrialized: a comparaction. *Arq. Cienc. Saúde UNIPAR*. 2014; 18(3): 151-156.
- 26 GOTTARDO ET, VIANA C, BARCELLOS VC, ZANETTE CM, BERSOT LS. Fermented meat sausages as vehicles of pathogenic microorganisms of public health importance. *B. CEPPA*. 2011; 29(1): 97-102.
- 27 FARTH JC, LIMA VY. Microbiological evaluation of colonial salamis marketed at Toledo fairgrounds. *Hig. Aliment*. 2018; 32(276/277): 74-79.
- 28 MIRANDA AL. Profile of antimicrobial susceptibility and epidemiological relationship of *Salmonella* spp. from food and clinical specimens. (Dissertação). Salvador: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia; 2013.
- 29 MELO DB. Clonal pattern and antimicrobial susceptibility profile of strains of *Escherichia coli* isolated from food and clinical specimens. (Dissertação). Salvador: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia; 2010.
- 30 KUCHENBECKER BS, RIBEIRO AR, CARDOSO M. Resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from animal products analyzed by the Brazilian Federal Inspection Service. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2009; 37(2): 143-149.
- 31 MARTIN B, GARRIBA M, HUGAS M, BOVER CS, VECIANANOGUÉS MT, AYMERICH T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol*. 2006; 107: 148-158.

6. ANEXOS

6.1 Anexo A – Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia

Instruções aos autores

Versão online ISSN 1678-4324

Atualizado: 21/10/2016

Informação geral

A Revista ***Brasileira de Biologia e Tecnologia - BAPT*** tem o objetivo de ser reconhecida internacionalmente por publicações originais de alta qualidade e pontualidade, e artigos altamente relevantes para pesquisas efetivas realizadas pela comunidade científica.

O jornal publica:

- Artigos de pesquisa originais: Refere-se a trabalhos de pesquisa inéditos. Cada manuscrito deve indicar claramente seu objetivo ou hipótese. Eles devem seguir a forma usual de apresentação, contendo título, título em execução, resumo (máximo de 250 palavras), palavras-chave (três a seis), introdução, materiais e métodos, resultados, discussão, agradecimentos e referências. Os números máximos das páginas são 12 (espaço simples digitado usando fonte Times New Roman)
- Notas curtas: Eles são um relatório sobre um único assunto, que deve ser conciso, mas definitivo. Esta seção destina-se a ser ampla e abranger metodologia e dados experimentais sobre assuntos de interesse para os leitores. título, autores e afiliações, resumo (máximo de 50 palavras), três a seis palavras-chave; texto não dividido em tópicos; confirmações (opcional), referências. Os números máximos das páginas são 6 (espaço simples digitado usando fonte Times New Roman).
- Artigos de revisão: Este é direcionado à apresentação dos avanços em biologia e tecnologia, contendo uma visão crítica, com o objetivo principal de beneficiar o grupo formado por alunos de pós-graduação e não especialistas na área. O arquivo deve conter título, autores e afiliações, resumo (até 250 palavras), seis palavras-chave, texto com legendas, agradecimentos (opcional) e referências. Os números máximos das páginas são 12.
- Carta ao Editor: Será uma apresentação de algum aspecto em biologia e tecnologia, escrito de forma didática, com o objetivo de beneficiar o grupo formado por alunos de graduação e pós-graduação, não especialistas na área. Os números máximos das páginas são 3 (espaço simples digitado usando fonte Times New Roman).

Política de Emissão Especial

- Os artigos de edições especiais deverão estar no escopo do BABT, conforme indicado na seção Objetivo & Escopo,
- Autores devem aceitar a política do BABT durante o ato de submissão,
- Um coordenador deve ser indicado e a correspondência será trocada apenas com ele,
- até 10 BABT limite de artigos,
- Os artigos devem ser revisados previamente pelos autores; não será submetido à revisão do par,
- Os artigos devem estar estritamente nas regras do BABT para submissão. Você pode encontrar instruções no link SciELO: www.scielo.br/revistas/babt/iinstruc.htm
- Você deve enviar o certificado de revisão para cada manuscrito, respectivamente pelos revisores,
- Sugerimos fortemente um bom manuscrito elaborado em inglês, não revisaremos o idioma inglês e será devolvido aos autores, se for o caso,
- Temos por política listar um bom artigo a ser revisado e publicado no número atual da revista, indicado por você com o consentimento do nosso Conselho Editorial,
- Por favor, envie junto artigos de uma Editorial e outra seção de Agradecimentos,
- O BABT não tem taxas para publicar ou acessar artigos.

Objetivos e Escopo

O objetivo da revista é avançar e disseminar o conhecimento em todas as áreas relacionadas:

- Agricultura, Agronegócio e Biotecnologia;
- Saúde Humana e Animal;
- Ciências Biológicas e Aplicadas;
- Ciência e Tecnologia de Alimentos / Rações;
- Ciências ambientais;
- Engenharia, Tecnologia e Técnicas.

O manuscrito deve ser preparado apenas em inglês. Sugerimos que o manuscrito seja revisado antes de ser submetido pela primeira vez por um falante nativo de inglês e, preferencialmente, experiência científica na área. Além disso, a assistência de serviços de edição independentes pode ser encontrada em

<http://journalexperts.com/>

Todos os serviços são pagos e organizados pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência pela publicação. "

O JORNAL NÃO PUBLICA:

- Artigos com alta similaridade com outros já publicados na literatura

- Itens que não são contemplados pelo escopo da revista,
- Artigos com referências desatualizadas. Recomenda-se que o autor atualize qualquer lista de referência no momento da submissão.
- Artigos com escrita pobre. Como o jornal oficial da língua é o inglês, recomenda-se que os autores forneçam a revisão por alguém que domine a língua e, de preferência, seja apresentada uma declaração do auditor sobre a conformidade em relação à língua inglesa.
- Artigos que descrevem atividades parciais relacionadas a outras pesquisas. Quando os autores desejam antecipar resultados de alta relevância sem que o trabalho seja concluído, onde a publicação de oportunidade (originalidade) é comprometida pelo fator tempo, sugerimos usar o modo "carta ao editor".
- Artigos de pesquisa específicos para uma realidade local onde os resultados não podem ser extrapolados, generalizados. Nesse caso, o Editor solicita que os autores procurem destacar a aplicação global desse conhecimento, mesmo que os resultados sejam relatados e se apliquem ao caso específico do site.
- Rever artigos que se sobrepõem com outros já publicados. Qualquer artigo de revisão deve necessariamente aprofundar alguma tese que não tem prova experimental, mas tem potencial para pesquisa. Ou consistindo de uma compilação de dados relevantes para o campo, mas estão espalhados na literatura.

Exemplos do que não é:

- Validação de um protocolo já estabelecido por instituições internacionais,
- Conjunto de medidas que demonstram o controle de um processo específico, como medições de glicose em uma população específica de animais, distribuição geográfica de uma determinada espécie animal, um conjunto de medidas com o objetivo de equipamentos de calibração, etc.
- Análise / composição de algo que já é conhecimento prévio,
- Alterações nos produtos que visam aplicações específicas, como o uso de aromatizantes para fazer um produto mais palatável.

ERRATA (ERRATA)

Uma errata aplica-se apenas aos casos em que a revista está efetivamente errada sem o conhecimento do autor. O autor tem um número de instâncias onde erros e erros podem e devem ser corrigidos, como nome do autor, palavras-chave, título, erros no texto principal, etc.

A revista submete o teste final do artigo revisado e pronto para publicação ao autor de correspondência com o prazo de 1 (uma) semana para revisão e correção do

artigo. Se o prazo de resposta expirar sem o retorno dos autores, a revista considera que o artigo foi aprovado (desde que o autor não tenha falado sobre a necessidade de quaisquer alterações / correções) e, portanto, pronto para publicação.

A submissão e publicação são **gratuitas** e não resultam em **fins comerciais e lucrativos**.

A submissão do manuscrito nos Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia implica que:

- O manuscrito não foi parcial ou inteiramente publicado. *O manuscrito não deve estar em processo de seleção para publicação em outro periódico e / ou outro idioma;*

- Os autores concordam em transferir os direitos autorais para o periódico e são responsáveis por todo o assunto e seu texto de consequências jurídicas.

- A submissão deve ter sido aprovada para todos os coautores e sempre que necessário, pelas autoridades da instituição onde o trabalho foi desenvolvido;

- Qualquer estudo envolvendo seres humanos deve ter *aprovação do Conselho de Revisão Institucional de Ética e o número do protocolo deve ser informado.*

- Ao trabalhar com animais experimentais, os regulamentos devem ser observados e o trabalho deve ser aprovado pelo comitê de ética local. *O número do protocolo deve ser informado.*

- Os autores devem garantir que o manuscrito não represente má conduta como falsificação, falsificação, plágio ou duplicação de datas. Em caso de má conduta de pesquisa confirmada, emitiremos um aviso de retratação para corrigir o registro científico. *Por favor, consulte a Declaração de Singapura em:* <http://www.singaporestatement.org/statement.html>

- A revista não se responsabiliza e / ou participa de eventuais ações relacionadas aos artigos publicados.

-A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

A submissão de manuscritos somente será aceita quando submetida eletronicamente, utilizando o seguinte link:
<http://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo>

Os Editores BAPT / its **condenam veementemente** o plágio e o autoplágio. Os autores devem certificar-se de que o conteúdo seja inédito e original. Idéias previamente publicadas devem ser devidamente citadas de acordo com as normas.

Os manuscritos submetidos são pré-avaliados em sua conformidade com as

normas, consistência, qualidade gramatical e inglês. Os autores precisam observar o conteúdo referente à relevância científica e / ou tecnológica e originalidade. Os manuscritos aceitos nesta etapa serão encaminhados para revisão por especialistas e encaminhados para julgamento de pelo menos dois árbitros. Qualquer violação de códigos de ética profissional, como plágio, uso fraudulento de dados, falsas alegações de autoria, deve ser levada muito a sério pelos editores.

Ao enviar um manuscrito, por favor, verifique:

- Se o artigo reclamar com todas as regras do BABT indicadas nesta diretriz,
- Se o artigo abranger a categoria correta (artigo original, revisão, nota curta ou carta ao editor). Às vezes, um bom artigo é rejeitado devido à categoria errada, como uma boa nota curta foi categorizada como artigo original.
- Os **nomes dos autores** devem aparecer apenas no cadastro da plataforma e **não no manuscrito**, para julgamento duplo-cego.
- Os autores devem indicar cinco especialistas na mesma área do manuscrito que eventualmente possam contribuir para o processo de avaliação. Os autores não devem indicar especialistas de colegas de trabalho ou do departamento / instituição do autor para questões éticas.

Autoria

Quaisquer alterações relativas à inclusão, exclusão ou reorganização dos nomes dos autores no manuscrito devem ser formalmente solicitadas durante o processo de avaliação. O documento pode ser encaminhado pelo sistema SciELO (plataforma ScholarOne), datado e cedido por todos os autores, incluindo ainda a confirmação de inclusão ou exclusão, contendo:

- Título do artigo,
- Motivo da alteração,
- Nomes dos autores organizados.

Não há taxa para acesso on-line, artigos de submissão e avaliação.

Para auxiliar os autores em relação aos termos da Revista, na Figura 1, é mostrada uma linha do tempo com o tempo típico entre a submissão e a publicação do artigo.

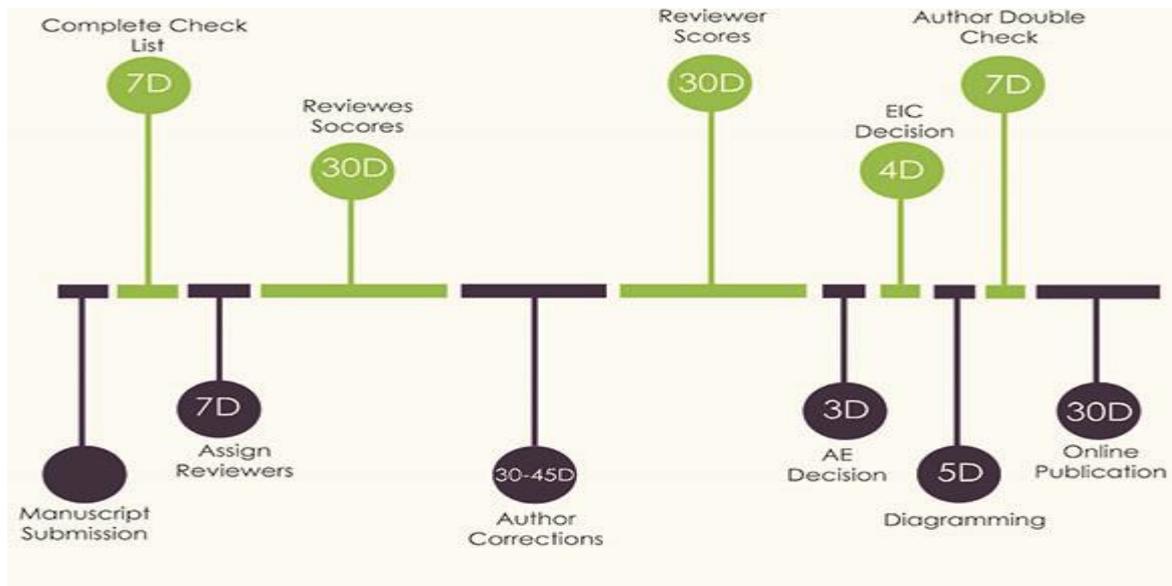


Fig 1: Tempo típico em relação ao processo de submissão de artigos

Organização do manuscrito

O manuscrito deve ser organizado de acordo com as seguintes categorias

Artigo de pesquisa: o arquivo deve conter *Título, Título em execução, Resumo (máximo de 250 palavras), Palavras-chave (três a seis), Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências*. Os números máximos das páginas são 12 (espaço simples digitado usando fonte Times New Roman).

Nota curta: o arquivo deve conter *título, autores e afiliações, resumo (máximo 50 palavras), três a seis palavras-chave; texto não dividido em tópicos; confirmações (opcional), referências*. Os números máximos das páginas são 6 (espaço simples digitado usando fonte Times New Roman).

Revisão: o arquivo deve conter *título, autores e afiliações, resumo (até 250 palavras), seis palavras-chave, texto com legendas, agradecimentos (opcional) e referências*. Os números máximos das páginas são 12 (espaço simples digitado usando Roman Font).

Carta ao Editor: o arquivo deve conter *título, autores e afiliações, resumo (máximo 50 palavras), três a seis palavras-chave; texto não dividido em tópicos; confirmações (opcional), referências*. Os números máximos das páginas são 3 (espaço simples digitado usando fonte Times New Roman).

O manuscrito deve ser organizado na seguinte ordem:

Título

Deve ser preciso, refletindo claramente o conteúdo do manuscrito.

Título Running

Deve ser curto, refletindo o conteúdo do manuscrito.

Resumo

Deve ser preparado o mais conciso possível, descrevendo o objetivo e os resultados do estudo.

Palavras-chave

Devem apresentar termos ou assuntos que representem o conteúdo do manuscrito, que serão utilizados no índice do artigo.

Introdução

Deve apresentar o objetivo do estudo, apresentando claramente as explicações e objetivos do artigo, oferecendo informações que permitam ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados, especificando quais novos progressos foram obtidos a partir da pesquisa. A introdução não deve conter dados ou conclusões do manuscrito referido.

Materiais e Métodos

Devem oferecer, de forma clara e concisa, informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o estudo. Técnicas padronizadas não precisam ser descritas em detalhes.

Resultados e Discussão

Estas seções podem ser apresentadas separadamente ou de forma combinada.

Resultados

Deve oferecer uma descrição concisa dos resultados obtidos nos experimentos necessários para sustentar as conclusões da pesquisa. A seção pode ser dividida em subseções, cada uma delas com uma legenda. Não repita no texto todos os dados apresentados em tabelas ou ilustrações que possam ser usadas quando necessário.

Discussão

Esta seção deve ser limitada ao conteúdo das novas informações, relacionando-as ao conhecimento pré-existente. Apenas as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Conclusões

As principais conclusões devem ser apresentadas de forma concisa e clara.

Agradecimentos

Esta seção é opcional. Deve ser breve, usado para agradecer / citar pessoas, bolsas de estudos, projetos e apoio recebido de organismos de promoção. Os nomes das organizações financiadoras devem ser integralmente escritos.

Referências

Somente as citações incluídas no texto devem ser apresentadas, referenciadas e organizadas em ordem numérica, numeral sobrescrito no texto principal, considerando o sobrenome do primeiro autor. **Veja a Figura 2** (abaixo) para orientação. Os resultados não publicados não devem ser incluídos na lista de referências. Apenas artigo na frente da impressão e com doi ou e-pub pode ser arbitrado. Observe que todas as referências dadas na lista devem ser citadas no texto e vice-versa.

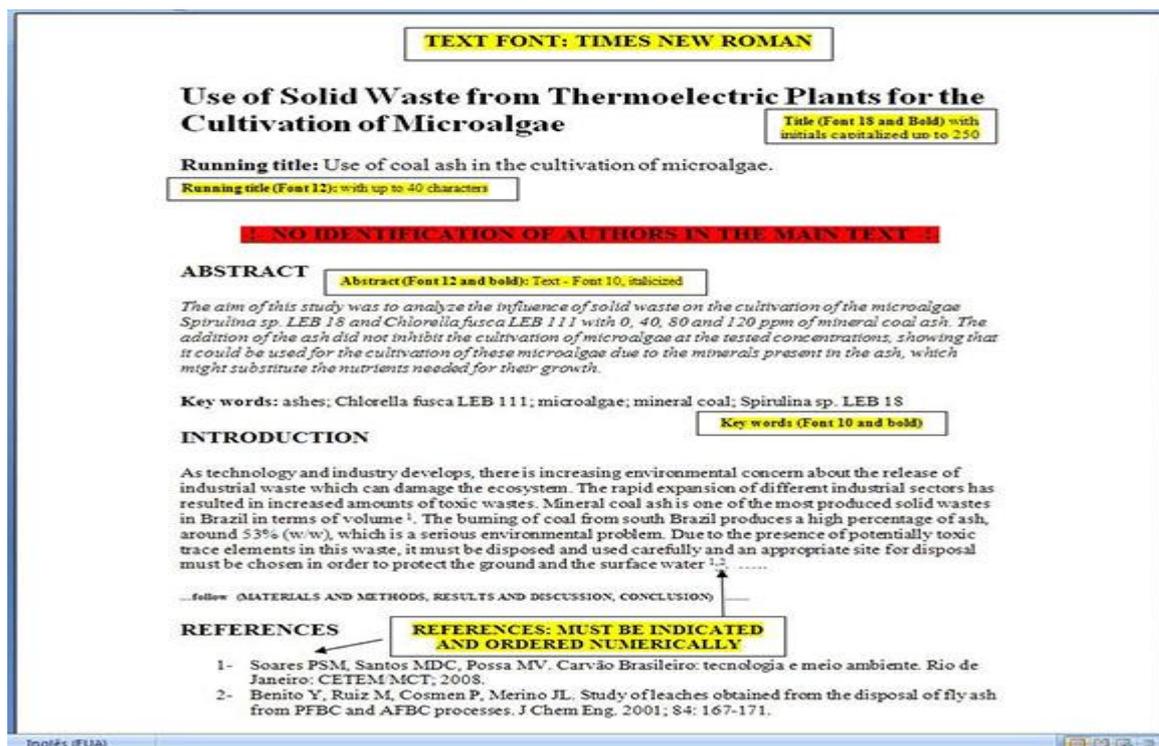


Fig 2: Aspecto geral do manuscrito com notas-chave para orientação do autor.

Preparação do manuscrito

O manuscrito deve ser preparado em uma coluna com no máximo 12 páginas (espaço simples digitado usando fonte Times New Roman) para manuscritos originais e de revisão, máximo de 6 páginas e 3 páginas para editor de letras (espaço simples digitado com fonte Times New Roman, incluindo tabelas, gráficos, figuras, imagens e referências) no formato WORD (.doc), tamanho de papel A-4 (210x297 cm), com margens (2,5 cm à esquerda, à direita 2,0 cm, superior e inferior 3,0 cm).

- Salve o arquivo no formato .doc.
- O periódico é publicado on-line, portanto, os números podem ser em cores.
- Abreviaturas de termos e símbolos devem seguir as recomendações das unidades de acordo com SI (International Systems of Units).
- Nomes científicos: O Código Internacional de Nomenclatura Zoológica e o Código Internacional de Nomenclatura para algas, fungos e plantas devem ser observados.

Título (fonte 18 e negrito)

Com iniciais em maiúsculas até 250 caracteres.

Título em execução (Fonte 12):

com até 40 caracteres.

Autores e afiliação institucional

Não deve haver informações que identifiquem autoria, endereço institucional ou e-mail no manuscrito. Esta informação será registrada no momento da submissão do manuscrito e colocada no artigo somente após sua aceitação.

Abstract (Fonte 12 e negrito)

Texto - Fonte 10, em itálico com até 200 palavras (100 palavras para notas curtas). O estilo da fonte deve ser normal para nomes científicos, sendo realçado no texto.

Palavras-chave (Fonte 10 e negrito)

Fonte 10, separadas por uma vírgula. Deve haver pelo menos 3 (três) e até 6 (seis) termos.

INTRODUÇÃO (Fonte 12, negrito e maiúscula)

Texto - Fonte 11, coluna 1, espaço simples e sem tabulação nos parágrafos.

MATERIAL E MÉTODOS (Fonte 12, negrito e maiúsculas)

Texto - Fonte 11, uma coluna, espaço simples e sem tabulação nos parágrafos. Para títulos e subtítulos, use os seguintes níveis:

- Primeiro nível - Outras seções podem ser criadas: maiúsculas, fonte 12, negrito.
- Segundo nível: somente a primeira letra de cada palavra é maiúscula, fonte 11, negrito.
- Terceiro nível: somente a primeira letra de cada palavra é maiúscula, fonte 11, em itálico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO (Fonte 11, negrito e maiúscula)

Texto - Fonte 11, coluna 1, espaço simples e sem tabulação nos parágrafos.

CONCLUSÕES (Fonte 12, negrito e maiúsculas)

Texto - Fonte 11, coluna 1, espaço simples e sem tabulação nos parágrafos.

AGRADECIMENTOS (Fonte 12, negrito e maiúscula)

Texto - Fonte 11, espaço simples e sem tabulação nos parágrafos.

REFERÊNCIAS (Fonte 12)

A lista de referências deve estar na Fonte 10, com tabulação especial de 0,3 cm, sendo referenciada e organizada em ordem numérica. A lista completa de referências, no final do artigo, deve seguir o estilo Vancouver, ver link abaixo: (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

- Os títulos das revistas devem ser abreviados como *Braz Arch Biol Technol*.
- O formato para a lista de abreviaturas dos periódicos pode ser encontrado em:
 - No periódico específico, ou
 - Abreviaturas do Título do Jornal

ISI. <http://www.efm.leeds.ac.uk/~mark/ISlabbr/> ; ou

- Revistas biológicas e abreviações, ou
 - Index Medicus - abreviações de títulos de periódicos, ou
 - Abreviaturas da palavra do título: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>
- Todas as referências citadas no texto devem estar na lista de referências e vice-versa.

- Lista de referências:

A lista completa de referências, no final do artigo, deve seguir o estilo Vancouver (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html) em ordem numérica.

- Nota Importante:

Não haverá restrições quanto ao idioma de origem do artigo de referência, apesar de a recomendação estar em inglês, porém o título deve ser traduzido e apresentado em inglês, entre parênteses.

- Artigo do periódico

Autor (es) do artigo. Título do artigo. Título da revista, abreviado em itálico. Data da publicação; volume (número / suplemento): página inicial-final do artigo.

Exemplos:

- Um autor até seis autores: Pandey A. Desenvolvimentos recentes em fermentação em estado sólido. *Process Biochem.* 1992; 27:109-117.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Transplante de órgão sólidos em pacientes infectados pelo HIV. *N Engl J Med.* 2002; 347 (4): 284-287.

-Mais de seis autores: (relacione os seis primeiros autores seguidos de "et al.") Arakaki AH, Vandenberghe LPS, Thomaz Soccol V, Masaki R, Rosa Filho EF, Gregório A, et al. Otimização da Produção de Biomassa com Bioacumulação de Cobre por Leveduras em Fermentação Submersa. *Braz Arch Biol Technol.* 2011; 54 (5): 1027-1032.

- Artigo na Web

Autor (es) do artigo. Título do artigo. Título da revista abreviado em itálico [periódico na internet]. Data de publicação [data de adesão]; volume (número): número de páginas. Disponível a partir de: endereço do *site*.

Exemplo:

Nandan A, Gaurav A, Pandey A e Nampoothiri KM. Aminopeptidase específica de arginina de *Lactobacillus brevis*. *Braz Arch Biol Technol* [Internet]. 2010 [citado 2011 outubro 19]; 53 (6): 1443-1450. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S151689132010000600021&lng=pt&nrm=iso&tlng=en

- Nos livros

Autores. Título do livro. Edição. Cidade: Editora; Ano.

Exemplo:

RP de Tengerdy Fermentação de substrato sólido para produção de enzimas. Em: Pandey A, editor. Avanços na biotecnologia. Nova Deli: editores e distribuidores educacionais; 1998.

-Capítulo no livro

Autores. Título do capítulo. Em: editores. Título do livro. Edição. Cidade: Editora; Ano. Páginas de citação.

Exemplo:

RP de Tengerdy Fermentação de substrato sólido para produção de enzimas. Em: Pandey A, editor. Avanços na biotecnologia. Nova Deli: editores e distribuidores educacionais; 1998. p. 13-16.

- Em conferências

Autor (es) do trabalho. Título do trabalho apresentado. Em: editor (es) responsável (is) pelo evento (se houver). Título do evento: Atas do... título do evento; data do evento; lugar do evento. Cidade de publicação: Editora; Ano de publicação. Página final inicial do trabalho.

Exemplo:

SEMINÁRIO BRASILEIRO DE EDUCAÇÃO, 3., 1993, Brasília. Anais. Brasília: MEC, 1994. 300 p.

-Parte do site / homepage

Autor (es) da página inicial (se houver). Título [homepage na internet]. Cidade: instituição; data (s) de registro [data da última atualização com a expressão "atualizado em"; data de acesso com a expressão "acessado em"]. Título da parte da página inicial. Disponível a partir de: endereço do site.

UNIDADES E ABREVIATURAS

O sistema "SI" deve ser usado. No caso de outras unidades, elas devem ser adicionadas entre parênteses. Somente as abreviações padrão para as unidades devem ser usadas. Pontos não devem ser incluídos nas abreviaturas.

TABELAS

Devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e inseridas em lugar próprio no texto. Um título breve e descritivo deve ser incluído acima de cada tabela e as explicações colocadas abaixo como um subtítulo.

Formatação das Tabelas:

- Título e conteúdo: Fonte Times New Roman 10.
- Notas de rodapé: Fonte Times New Roman 9.
- Largura 16.5 cm.
- Linhas verticais e diagonais não devem ser usadas em tabelas.
- As tabelas devem ser elaboradas e editadas em células, utilizando os recursos do editor de texto. Observação: As tabelas no formato de figura (**jpg, tiff ou png**) não são aceitas ou contêm linhas desenhadas.

FIGURAS

Devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e citadas no texto em ordem numérica.

- As figuras devem ser apresentadas preferencialmente em cores.
- As letras e os números devem ter um tamanho legível após a redução ou impressão, use as seguintes fontes: Times New Roman, 18.
- As imagens devem ser ajustadas para a largura (16,5 cm) da página e devem ser menores que a página para permitir inclusão da legenda.
- As figuras devem ser apresentadas em arquivo separado e em formato **tiff** com um mínimo de 300 dpi.
- Ilustrações devem ser citadas no texto com a palavra "Figura", sem serem abreviadas quando fazem parte de uma frase. Quando aparece entre parênteses, deve ser abreviado "(Fig.)".
- Quando as figuras apresentam partes diferentes, cada uma deve ser indicada em maiúsculas (Fig. 1A, B, C, etc).
- Taxas de página: não haverá cobranças de página.

PROCESSO DE PUBLICAÇÃO COMPLETA

- Provas: Após o layout, o manuscrito é convertido em pdf (folha de prova) e encaminhado aos autores para aprovação. As provas devem retornar à produção editorial em no máximo 1 semana. Outras alterações após esta etapa, no manuscrito aprovado, não serão aceitas.

Alana Marielle RG Kluczkovski, DSc

Arquivos Brasileiros de Biologia e Tecnologia

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775-CIC

81350-010 Curitiba-PR, Brasil

Tel.: + 5541-3395-2018

Email: babt@tecpar.br

6.2 Anexo B - Confirmação da Submissão

19/02/2019 ScholarOne Manuscripts
<https://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo> 1/2
Brazilian Archives of Biology and Technology
Confirmação da submissão
Obrigado pela sua submissão

Submetido para

Brazilian Archives of Biology and Technology

ID do manuscrito

BABT-2019-0101

Título

Fermented Meat Sausages Produced in Francisco Beltrão – Paraná Town:
Physicochemical and Microbiological Analysis and Bacterial Resistance Profile

Autores

Henning, Katiana
Casaril, Kérley

Data da submissão

19-fev-2019

Painel do autor Painel do autor

19/02/2019 ScholarOne Manuscripts
<https://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo> 2/2

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2019. Todos os direitos reservados.

ScholarOne Manuscripts e ScholarOne são marcas regist

6.3 Anexo C – e-mail de confirmação da submissão

Adim BAPT <onbehalf@manuscriptcentral.com>
Ter, 19/02/2019 18:30
Você;
kati_henning@hotmail.com; kcasaril@gmail.com
19-Feb-2019

Dear Ms. Henning:

Your manuscript entitled "Fermented Meat Sausages Produced in Francisco Beltrão – Paraná Town: Physicochemical and Microbiological Analysis and Bacterial Resistance Profile" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Brazilian Archives of Biology and Technology.

Your manuscript ID is BAPT-2019-0101.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/babt-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Brazilian Archives of Biology and Technology.

Sincerely,

Brazilian Archives of Biology and Technology Editorial Office