

Atividade antimicrobiana de conservantes alimentares sobre a bactéria *Weissella viridescens*

Antimicrobial activity of food preservatives against *Weissella viridescens*

¹Robson Pierre Naboa; ²Rodrigo de Araújo Soares; ³Cristiane Ayala de Oliveira; ⁴George Joaquim de Andrade Silva; ⁵Victor Maximiliano Reis Tebaldi; ⁶Gláucia Alves e Silva

¹Graduando em Tecnologia de Alimentos – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (robson.pierre@aluno.ifsertao-pe.edu.br)

² Professor do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (rodrigo.araujo@ifsertao-pe.edu.br)

³Professora do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (cristiane.ayala@ifsertao-pe.edu.br)

⁴Graduando em Tecnologia de Alimentos – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (jeorge.joaquim@aluno.ifsertao-pe.edu.br)

⁵Professor Adjunto do curso de Nutrição – Centro Universitário de Barra Mansa (victormaxibio@yahoo.com.br)

⁶Professora do Curso de Engenharia Florestal – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso (glaucia.silva@ifmt.edu.br)

RESUMO: A bactéria *Weissella viridescens* é bem conhecida por causar deterioração na superfície de produtos cárneos embalados a vácuo, mesmo sob condições refrigeradas. Para impedir a deterioração microbiana dos alimentos, aditivos alimentares podem ser usados. Eles são utilizados com a finalidade de tornar os alimentos mais seguros ou mais atraentes. Os conservantes são um tipo de aditivo alimentar adicionado aos alimentos para prolongar a vida útil e impedir que os produtos sejam decompostos por microrganismos. Este estudo teve como objetivo avaliar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de quatro conservantes alimentares contra a *W. viridescens*: benzoato de sódio, metabissulfito de sódio, nitrito de sódio e sorbato de potássio. Benzoato de sódio e sorbato de potássio foram testados em concentrações variando de 50.000 a 1.000 µg.mL⁻¹, enquanto nitrito de sódio e metabissulfito de sódio variaram de 20.000 a 156 µg.mL⁻¹. O metabissulfito de sódio apresentou a maior atividade (CIM 313 µg.mL⁻¹), seguido pelo nitrito de sódio (CIM 5.000 µg.mL⁻¹). Benzoato de sódio e sorbato de potássio não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Palavras-Chave: Aditivos alimentares. Produtos cárneos. Bactéria ácido-lática.

ABSTRACT: *Weissella viridescens* is well known to cause deterioration on the meat surface in vacuum packed meat products, even under refrigerated conditions. To impede microbial deterioration of foods, food additives can be used. They are designed to do a specific job of making food safer or more appealing. Preservatives are a type of food additive added to food to prolong shelf life and keep the products from being broken down by microorganisms. This study aimed to evaluate the minimum inhibitory concentrations (MIC) of four food preservatives against *W. viridescens*: sodium benzoate, sodium metabisulphite, sodium nitrite, and potassium sorbate. Sodium benzoate and potassium sorbate were tested at concentrations ranging from 50,000 to 1,000 µg.mL⁻¹. Sodium nitrite and sodium metabisulphite were tested at concentrations ranging from 20,000 to 156 µg.mL⁻¹. Sodium metabisulphite showed the greatest activity (MIC 313 µg.mL⁻¹) followed by sodium nitrite (MIC 5.000 µg.mL⁻¹). Sodium benzoate and potassium sorbate did not present any antimicrobial activity.

Keywords: Food Additives. Meat Products. Lactic acid bacteria.

1. INTRODUÇÃO

Para a indústria alimentícia, a qualidade e segurança dos alimentos é objetivo primordial a ser alcançado, seja qual for o produto elaborado. Assim, técnicas são utilizadas para garantir que o produto tenha alta qualidade e características desejáveis, sejam elas físicas, químicas ou microbiológicas. O uso de aditivos químicos é um dos métodos utilizados para obter tais objetivos, sendo seu uso regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). De acordo com a Portaria nº 540, da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), aditivo alimentar é “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento” (BRASIL, 1997). Vale ressaltar que nenhum método substitui a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e, por isso, é vedado o uso de aditivos com propósito de encobrir falhas no processamento e/ou manipulação; induzir o consumidor ao erro, engano ou confusão; ou esconder alterações ou adulterações da matéria-prima ou do produto elaborado (BRASIL, 2020).

Dentre as diversas classes de aditivos alimentares, os conservantes são de extrema importância na garantia e controle da segurança alimentar, uma vez que eles têm a função de inibir total ou parcialmente o crescimento e ação de microrganismos, sejam eles patogênicos ou não (FERREIRA et al., 2020). Além disso, têm a capacidade de preservar as características do alimento, sempre respeitando os limites estabelecidos pelas legislações (SOUZA et al., 2019). Cada conservante age de forma diferente frente aos mais diversos microrganismos e, por isso, a escolha do conservante deve respeitar, concomitantemente, a legislação e ter efetividade contra o microrganismo alvo.

A maioria dos microrganismos causam deterioração em carnes e seus produtos, pois fatores como pH, atividade de água e alto teor de nutrientes favorecem o crescimento microbiano (TEIXEIRA et al., 2021). Especificamente no caso de carnes embaladas à vácuo, as bactérias lácticas podem ser um problema, especialmente a *Weissella viridescens* (MARTINS et al., 2020).

A *W. viridescens* é uma bactéria do grupo ácido láctico (BAL), não patogênica, gram positiva, não formadora de esporos, catalase negativa e anaeróbia facultativa. São heterofermentativas, produzindo dióxido de carbono, ácido láctico e acético a partir da fermentação de açúcares (MA et al., 2022). Podem ser encontradas em uma grande variedade de *habitats*, desde a epiderme até na saliva ou fezes de seres humanos (MARTINS et al., 2020). Essa bactéria possui boa resistência térmica, crescem na faixa de temperatura de 15 °C a 45 °C, o que resulta em elevada capacidade adaptativa, tornando-se uma bactéria importante para a indústria de carnes (KAMENÍK et al., 2015). Bactérias do gênero *Weissella* estão associadas à deterioração de produtos cárneos, causando esverdeamento, *off flavor* e formação de limo (TEIXEIRA et al., 2021), o que leva os consumidores a rejeitar esses produtos.

Diante desse problema, o trabalho objetivou determinar a sensibilidade da bactéria *W. viridescens* frente a quatro importantes conservantes alimentares: nitrito de sódio, metabissulfito de sódio, benzoato de sódio e sorbato de potássio. Vale salientar que não foram encontrados trabalhos testando esses conservantes na inibição da *W. viridescens*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Compostos antimicrobianos

Os conservantes alimentares testados foram o sorbato de potássio (SP), benzoato de sódio (BS), nitrito de sódio (NS) e metabissulfito de sódio (MBS), todos fornecidos pela Neon[®] (Suzano, SP) e com pureza superior a 98%. A seleção destes aditivos foi baseada na reconhecida eficácia contra um grande espectro de microrganismos e pelo baixo custo, além de serem consentidos pela legislação brasileira para uso em alimentos.

2.2 Cepas bacteriana e meios de cultura

A cepa utilizada no estudo foi a *Weissella viridescens*, gentilmente cedida pela profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, da Universidade Federal de Lavras, MG. Para as análises microbiológicas foram utilizados os seguintes meios de cultura e diluentes: Água peptonada tamponada 0,1%, Caldo Man Rogosa e Sharpe (MRS) e Ágar Man Rogosa e Sharpe (MRSA), todos da marca Kasvi (Curitiba – PR).

2.2.1 Manutenção e padronização da cepa de *Weissella viridescens*

A bactéria foi estocada a -18 °C em microtubos contendo meio de congelamento [glicerol (150 mL), peptona (5 g), extrato de levedura (3 g), NaCl (5g), H₂O (1.000 mL) pH (7,2 ± 0,2)].

Para a padronização das contagens do número de unidades formadoras de colônias (UFC), foi elaborada a curva de crescimento da bactéria. Este procedimento manteve o número de UFC no inóculo da cultura reveladora sobre controle (10¹¹ UFC.mL⁻¹).

2.2.2 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos conservantes

Após preparação do meio, conforme recomendações do fabricante, os conservantes foram adicionados, nas concentrações mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações testadas para a determinação da CIM de conservantes alimentares.

Conservantes alimentares	Concentração (µg.mL ⁻¹)							
	50.000	25.000	12.500	7.500	5.000	4.000	2.000	1.000
Sorbato de potássio (SP)	50.000	25.000	12.500	7.500	5.000	4.000	2.000	1.000
Benzoato de sódio (BS)	50.000	25.000	12.500	7.500	5.000	4.000	2.000	1.000
Nitrito de sódio (NS)	20.000	10.000	5.000	2.500	1.250	625	313	156
Metabissulfito de sódio (MBS)	20.000	10.000	5.000	2.500	1.250	625	313	156

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pela técnica de microdiluição em placa de microtitulação estéril contendo 96 poços, de acordo com o NCCLS M7-A6 (NCCLS, 2003), com modificações. Um volume de 200 µL de meio de cultura MRS contendo os conservantes foi colocado nos micropoços das placas. Em seguida foram adicionados 10 µL do inóculo padronizado (10¹¹ UFC.mL⁻¹). Também foram realizados os controles negativo (200 µL de meio de cultura MRS sem conservante e sem inóculo) e positivo (200 µL de meio de cultura MRS sem conservante e com 10 µL do inóculo padronizado). As placas de microtitulação foram incubadas a 35 °C por 24 h, com posterior leitura visual para determinação da CIM. O teste foi realizado em triplicata. O micropoço com

menor concentração do conservante que não apresentou turvação do meio, ou seja, sem crescimento visível, foi considerada a CIM. A fim de confirmar o resultado, uma alíquota das suspensões contidas nos micropoços foi semeada por meio de estrias em placas de Petri contendo Ágar MRS, seguida de incubação a 35 °C/24 h. A ausência de crescimento de colônias visíveis nas placas confirmou a efetividade do conservante alimentar testado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que, dos quatro conservantes analisados, apenas o nitrito de sódio e o metabissulfito de sódio inibiram a bactéria *W. viridescens*, nas concentrações 5.000 µg.mL⁻¹ e 313 µg.mL⁻¹, respectivamente. O sorbato de potássio e o benzoato de sódio não inibiram a bactéria em nenhuma das concentrações testadas.

Favero et al. (2011) relata que o metabissulfito de sódio pode causar danos à membrana celular dos microrganismos devido à penetração do SO₂ na parede celular, com a inativação da replicação do DNA, além de causar rupturas nas enzimas relacionadas com a membrana citoplasmática.

O nitrito de sódio também apresentou efetividade, porém em concentração superior aquela apresentada pelo metabissulfito de sódio. De acordo com Amin e Oliveira (2006), baixas concentrações de nitrito de sódio fixam a cor dos produtos cárneos curados, porém não produzem um efeito antibacteriano significativo, sendo necessárias concentrações maiores. Foi observado que o nitrito de sódio precisa de uma alta concentração para inibir microrganismos, o que pode explicar os resultados encontrados. Concentrações superiores a 200 µg.mL⁻¹ de nitrito de sódio exercem ação bacteriostática, especialmente sobre os anaeróbios, que é o caso da *W. viridescens* (AMIN; OLIVEIRA, 2006). Embora os nitritos tenham sido usados por muitos anos, a formação de nitrosaminas potencialmente cancerígenas a partir de nitritos é uma das principais causas de preocupação (SUBRAMANIAN; KAGLIWAL; SINGHAL, 2014).

Os conservantes sorbato de potássio e benzoato de sódio, nas concentrações testadas, não foram eficazes na inibição dessa bactéria. Uma possível explicação pode ser o pH do meio. O pH do MRS, sem adição de conservantes, é aproximadamente 5,84; entretanto este elevou-se para próximo da neutralidade (pH 6,23) quando adicionado sorbato de potássio na maior concentração testada (50.000 µg.mL⁻¹). É sabido que os sorbatos apresentam maior eficiência em pH mais ácidos (HWANG et al., 2015) e, portanto, a atividade antimicrobiana do sorbato de potássio diminui com o aumento do pH extracelular (WANG et al., 2018).

A atividade antimicrobiana do benzoato de sódio ocorre quando ele está na forma não dissociada, passando através da membrana e liberando prótons no citoplasma bacteriano (SOUZA, 2019). O pH é decisivo para a ação antimicrobiana do benzoato de sódio pois ele é mais efetivo em meio ácido devido à prevalência do ácido benzoico, sua forma não dissociada. Ao adicionar o benzoato de sódio na maior concentração (50.000 µg.mL⁻¹), o pH do meio elevou-se para 5,87, o que pode explicar a baixa efetividade do conservante. De acordo com Oliveira e Reis (2017), pH acima de 5 pode reduzir a atividade do benzoato.

4. CONCLUSÃO

Os conservantes sorbato de potássio e benzoato de sódio não inibiram a cepa bacteriana em nenhuma das concentrações testadas, comprovando a importância do pH do meio para sua efetividade.

Conclui-se que, dentre os conservantes testados, o mais eficiente foi o metabissulfito de sódio por necessitar de uma menor concentração para causar inibição da *W. viridescens*.

5. AGRADECIMENTOS

O primeiro autor agradece ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano (IFSertão PE) pela concessão de bolsa PIBIC – Edital nº 52/2021.

6. REFERÊNCIAS

- AMIN, M; OLIVEIRA, J. V. Efeito do uso do nitrato e nitrito na inibição de *Clostridium perfringens* tipo A em linguiça bovina curada. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 13-24, 2006. Disponível em:<<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-457564>>. Acesso em: 10 nov. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Portaria nº 540, 27 de out. de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definição, classificação e emprego. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 out. 1997, Seção 1. Disponível em:< <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/portaria-no-540-de-27-de-outubro-de-1997.pdf/view>>. Acesso em: 09 out. 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Publicada norma sobre uso de aditivos alimentares**, 2020. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/publicada-norma-sobre-uso-de-aditivos-alimentares#:~:text=Tamb%C3%A9m%20%C3%A9%20proibido%20o%20aditivo,induzir%20o%20consumidor%20a%20enganos>.
- FAVERO, D. M.; RIBEIRO, C. S. G.; AQUINO, A. D. Sulfitos: Importância na indústria alimentícia e seis possíveis malefícios à população. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 1, p. 11-20, 2011. <https://doi.org/10.20396/san.v18i1.8634684>
- FERREIRA, R. D.; SOARES, R. A.; CARVALHO, L. A.; SILVA, G. A.; OLIVEIRA, C. A.; ALVES E SILVA, G. Determinação da concentração inibitória de conservantes alimentares para o controle de *Salmonella Typhimurium*. **Holos**, v. 4, e10069, p. 1-14, 2020. <https://doi.org/10.15628/holos.2020.10069>
- HWANG, C. A.; HUANG, L.; JUNEJA, V. Effect of acidified sorbate solutions on the lag-phase durations and growth rates of *Listeria monocytogenes* on meat surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 6, p. 1154–1160, 2015. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-408>
- KAMENÍK, J.; DUŠKOVÁ, M.; ŠEDO, O.; SALÁKOVÁ, A.; PAVLÍK, Z.; ZDRÁHAL, Z.; KARPÍŠKOVÁ, R. Lactic acid bacteria in hot smoked dry sausage (non-fermented salami): Thermal resistance of *Weissella viridescens* strains isolated from hot smoked dry sausages. **Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 492-495, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.012>
- MA, P.; DUAN, N; YE, H.; XIA, Y.; DING, Z.; WANG, Z. Selection, truncation and fluorescence polarization based aptasensor for *Weissella viridescens* detection. **Talanta**, v. 246, e.123499, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123499>
- MARTINS, W. F.; LONGHI, D. A.; ARAGÃO, G. M. F.; MELERO, B.; ROVIRA, J.; DIEZ, A. M. A mathematical modeling approach to the quantification of lactic acid bacteria in vacuum-packaged samples of cooked meat: Combining the TaqMan-based quantitative PCR

method with the plate-count method. **International Journal of Food Microbiology**, n. 318, e.108466, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108466>

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **NCCLS M7-A6: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. Pennsylvania (USA), 2003.

OLIVEIRA, P. H. R.; REIS, R. R. Ácido Benzoico (CAS 65-85-0). **Revista virtual de química**, v. 9, n. 6, p. 2673-2687, 2017. <https://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20160156>

SOUZA, B. A.; PIAS, K. K. S.; BRAZ, N. G.; BEZERRA, A. S. Aditivos Alimentares: Aspectos Tecnológicos e Impactos na Saúde Humana. **Revista Contexto e Saúde**, v. 19, n. 36, p. 5-13, 2019. <https://doi.org/10.21527/2176-7114.2019.36.5-13>

SUBRAMANIAN, J. H.; KAGLIWAL, L. D.; SINGHAL, R. S. Permitted Preservatives – Nitrites and Nitrates. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 92-98, 2014.

TEIXEIRA, C. G.; SILVA, R. R.; FUSIEGER, A.; MARTINS, E.; FREITAS, R.; CARVALHO, A. F. The *Weissella* genus in the food industry: A review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, e8310514557, 2021. <https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14557>

WANG, J.; MA, M.; YANG, J.; CHEN, L.; YU, P.; WANG, J.; GONG, D.; DENG, S.; WEN, X.; ZENG, Z. *In vitro* antibacterial activity and mechanism of monocaprylin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 12, p. 1988–1996, 2018. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-18-248>



O conteúdo deste trabalho pode ser usado sob os termos da licença Creative Commons Attribution 4.0. Qualquer outra distribuição deste trabalho deve manter a atribuição ao(s) autor(es) e o título do trabalho, citação da revista e DOI.