

## Inativação de patógenos em carne bovina fresca revestida com monocamada comestível de quitosana

<sup>1</sup>Alessandra Santana Silva, <sup>2</sup>Bartolomeu Warlene Silva Souza, <sup>1</sup>Aline Simões da Rocha Bispo, <sup>1</sup>Mariza Alves Ferreira, <sup>1</sup>Norma Suely Evangelista-Barreto\*

<sup>1</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Rua Rui Barbosa, 710, Centro, CEP 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brasil. E-mails: alessandraufrb@hotmail.com, alinesimoesbispo@gmail.com, marizaalfer@gmail.com, \*nsevangelista@ufrb.edu.br

<sup>2</sup> Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Pesca, Campus do Pici, Avenida Mister Hull, s/n, CEP 60455-760, Fortaleza, CE, Brasil. E-mail: souzabw@gmail.com

**Resumo:** Este estudo foi conduzido com o objetivo de reduzir a contaminação de patógenos de importância alimentar em carne bovina fresca usando revestimento comestível de quitosana. Testes antimicrobianos com filmes contendo quitosana de 1,0%, 1,5% e 2,0% apresentaram atividade antimicrobiana, com o filme de 2% apresentando os maiores halos de inibição (16 a 22 mm) para *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis e *Listeria monocytogenes*. Após a contaminação intencional com cada bactéria (6 log UFC mL<sup>-1</sup>), as amostras de carne bovina tratadas com solução de quitosana a 2% e mantidas a 4 °C por 72 h, tiveram sua contaminação reduzida em 6 ciclos logarítmicos quando comparadas com o controle (sem quitosana) (p < 0,01). Os dados demonstram o grande potencial do revestimento de quitosana para a redução da contaminação bacteriana de carne bovina.

**Palavras chave:** Atividade antimicrobiana, Revestimento comestível, Bactérias patogênicas.

## Inactivation of pathogens on fresh beef coated with chitosan edible monolayer

**Abstract:** This study was conducted with the aim of reducing contamination by food-important pathogens in fresh beef using edible chitosan coating. Antimicrobial tests with 1.0%, 1.5% and 2.0% chitosan films showed antimicrobial activity, with the 2% film showing the largest inhibition halos (16 to 22 mm) for *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. After intentional contamination with each bacterium (6 log CFU mL<sup>-1</sup>) the beef sample treated with 2% chitosan suspension and kept at 4 °C for 72 h, had their contamination reduced in 6 log cycles when compared with the control (without chitosan) (p < 0.01). The data demonstrate the great potential of chitosan coating to reduce bacterial contamination of beef.

**Key words:** Antimicrobial activity, Edible coating, Pathogenic bacteria.

A carne bovina é um componente importante na dieta do brasileiro e atualmente, o Brasil ocupa a posição de maior rebanho bovino do mundo (214,7 milhões de cabeças), segundo maior consumidor (42,12 kg/habitante/ano) e maior exportador (2,2 milhões toneladas equivalente/carcaça). Do total de carne produzida no país, 80% abastece o mercado interno segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne [ABIEC] (2019).

Dentre os setores de varejo de carnes, as feiras livres é um dos meios de comércio do produto em cidades interioranas (Diniz et al., 2012), por se tratar de um hábito cultural. No entanto, os riscos biológicos associados a esse tipo de comercialização aumentam em virtude das condições precárias das feiras, como acondicionamento, presença de animais domésticos e o excesso de manipulação, além de infraestruturas precárias. Esses fatores associados às características intrínsecas da carne bovina, como alta atividade de água e pH favorável, por exemplo, favorecem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, colocando os produtos cárneos entre os gêneros alimentícios mais envolvidos em surtos alimentares (Shekarforoush et al., 2015). No Brasil, entre 2009 e 2018, a carne bovina foi o sexto alimento mais envolvido em surtos alimentares, estando associada a 361 surtos (Brasil, 2018).

Uma alternativa proposta para reduzir o risco de microrganismos deteriorantes e patogênicos indesejáveis na carne fresca é o uso de revestimentos comestíveis biopoliméricos. A quitosana é um polissacarídeo obtido da desacetilação parcial da quitina, um biopolímero atóxico e biodegradável, que tem sido usado como revestimento devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes, além de atuar como barreira ao oxigênio (Cardoso et al., 2016). Sabendo que a qualidade sanitária durante a manipulação da carne tem sido alvo de preocupação em todas as etapas de produção, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência do revestimento comestível em monocamada de quitosana, em bifés de carne fresca, na redução da carga microbiana de patógenos de importância alimentar.

Os filmes com diferentes concentrações de quitosana (1,0%; 1,5%; 2,0%) foram preparados por diluída em suspensão de ácido láctico a 1% (v/v) e glicerol a 0,2% (v/v), sob agitação por 4 h.

Trinta e cinco mililitros da solução de quitosana foram colocados em placas de Petri para secagem em estufa com circulação de ar por 24 h a 40 °C (Jones & Medicott, 1995). A atividade antimicrobiana foi realizada por meio do teste de difusão em disco utilizando filmes de 6 mm de diâmetro em triplicata (Karaman et al., 2003) frente aos patógenos *E. coli* ATCC 25922, *S. Enteritidis* ATCC13076 e *L. monocytogenes*, segundo o Centro de Referência para Lactobacilos [CERELA]. Inóculos bacterianos padronizados ( $\log 6$  UFC mL<sup>-1</sup>) foram espalhados em ágar Muller-Hinton, e em seguida, procedeu-se à incubação em temperatura de 37 °C por 24 h. A atividade antimicrobiana da quitosana foi observada pela formação de halos de inibição (Goy & Assis, 2014) que foram medidos com paquímetro digital (Digimess®), expressos em milímetros, e o melhor resultado foi selecionado para aplicação do revestimento nas amostras de carne.

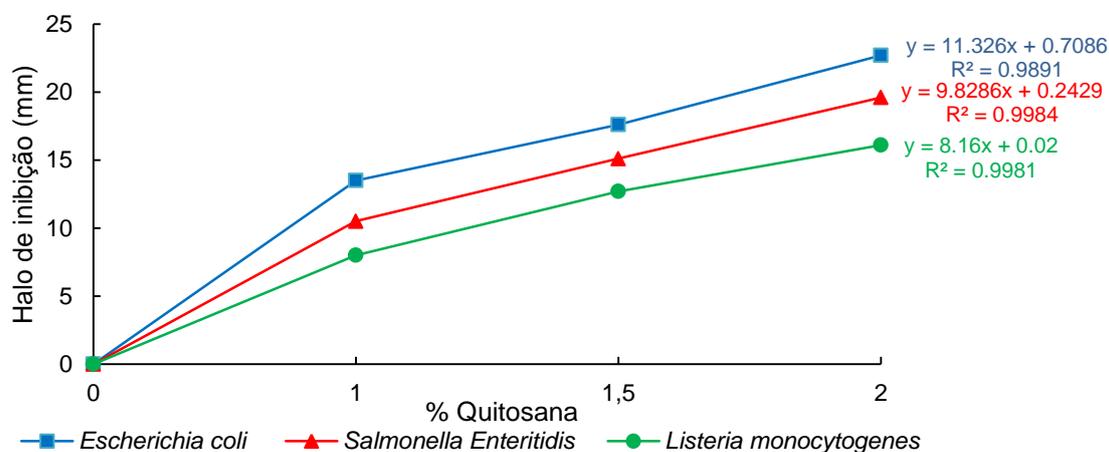
Para a atividade antimicrobiana no revestimento em monocamada da quitosana, cortes de carne bovina (aproximadamente 10 Kg) foram divididos em três grupos de acordo com o microrganismo teste (*E. coli*, *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes*) e o grupo controle. Em cada grupo, cada corte de carne foi subdividido em 22 bifés de 100 g. Duas unidades foram submetidas à análise microbiológica para verificar a carga microbiana inicial. Para a contaminação intencional, as demais unidades foram inoculadas com suspensão bacteriana ( $\log 6$  UFC mL<sup>-1</sup>) com o microrganismo indicador. Após 30 minutos, 10 unidades foram imersas em 500 mL de solução de quitosana a 2% (obtida comercialmente da Polymar Indústria e Comércio Ltda, de alto peso molecular e desacetilação a 90%) por 10 segundos. Para o grupo controle foi usado água destilada estéril. As amostras foram mantidas a 4 °C em estufa BOD e após 72 h foram realizadas análises microbiológicas seguindo protocolos estabelecidos por Silva et al. (2010). Todo o experimento foi conduzido em triplicata. Para análise estatística, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e aplicado teste de Tukey ( $p \leq 0,01$ ). A análise de regressão foi realizada para avaliar as diferentes concentrações de quitosana. O software utilizado foi o SISVAR, versão 5.6 (Ferreira, 2011).

A determinação dos halos de inibição mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,01$ ). O filme com 2% de

quitosana foi escolhido para os testes de revestimento por apresentar maior atividade antimicrobiana (halos variando de 16 a 22 mm) (**Figura 1**). O alto grau de desacetilação da quitosana (90%) foi um dos fatores que contribuiu para que o aumento na sua concentração melhorasse a atividade antimicrobiana

(Malinowska-Pañczyk et al., 2015). Segundo Rajoka et al. (2020), este grau é uma característica importante para determinar o desempenho da atividade antimicrobiana da quitosana, pois quanto mais alto, maior solubilidade em água e atividade ela terá.

**Figura 1** - Curva da análise de regressão das diferentes concentrações de quitosana frente as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* e *Listeria monocytogenes*.



A equação da regressão das diferentes concentrações da quitosana foi linear, mostrando a necessidade de estudos que testem o efeito antimicrobiano da quitosana em concentrações mais altas a fim de se obter uma concentração ótima (Figura 1). No presente estudo isto não foi possível devido às concentrações acima de 2% aumentarem a viscosidade da suspensão, inviabilizando sua utilização no revestimento na carne. A diferença dos halos de inibição entre as bactérias não foi significativa, mesmo *L. monocytogenes* sendo mais sensível (Figura 1). A resistência das bactérias à quitosana depende de fatores, como o tipo de microrganismo, tamanho do inóculo e a fase de crescimento do microrganismo (Malinowska-Pañczyk et al., 2015).

Com relação à eficiência do revestimento de quitosana nos bifes de carne, estes não se encontravam contaminados com os

microrganismos testes e quando tratados com a suspensão de quitosana a 2% em monocamada (após contaminação) apresentaram redução significativa ( $p < 0,01$ ) de 6 ciclos logarítmicos em relação às amostras controle após 72 h de refrigeração (Tabela 1).

A vantagem do revestimento em alimentos é que este processo pode ser feito por imersão, onde o produto é diretamente imerso em uma solução, e o excesso ao ser removido forma um filme sobre a superfície do alimento (Pinheiro et al., 2010). Além disso, a suspensão de quitosana apresenta maior potencial antimicrobiano quando comparado a filmes incorporados com quitosana, possivelmente pela dificuldade da quitosana em se difundir através da matriz do produto. Este fato foi observado por Ye et al. (2008) ao relatarem atividade anti-*Listeria* em filme incorporado com quitosana, enquanto Shekarforoush et al. (2015),

relatarem que soluções de quitosana a 2% foram

eficazes na redução de *L. monocytogenes*.

**Tabela 1** - Redução média da carga microbiana de carne bovina revestida com quitosana a 2% por 72 horas a 4 °C.

Tratamentos	Microrganismos (Log UFC g <sup>-1</sup> )		
	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i>
Sem quitosana	6,91b ± 0,02	5,99b ± 0,02	6,39b ± 0,01
Com quitosana	0,04a ± 0,01	0,11a ± 0,02	0,12a ± 0,02

UFC. Unidade formadora de colônia.

Outra vantagem para o revestimento comestível usando quitosana é que ele além de não alterar as características sensoriais do produto, mantendo o aroma e sabor característicos dos alimentos, também intensifica a cor e o brilho naturais da carne ao reduzir a oxidação do pigmento oximioglobina a metamioglobina (Cardoso et al., 2016), que provoca o escurecimento da carne, uma das principais alterações deste tipo de produto durante o armazenamento. Dessa forma, a quitosana, como conservante natural na carne e produtos cárneos, minimizaria o uso de conservantes químicos como o nitrito, que tem sido responsável pela formação de nitrosaminas secundárias, implicadas na incidência de câncer em humanos (Oliveira et al., 2005).

O revestimento comestível de quitosana a 2% em carne bovina foi eficiente na redução de patógenos importantes para a segurança alimentar. Além disso, trata-se de uma alternativa viável e simples que pode ser utilizada em carcaças de carne como forma de minimizar a contaminação microbiana pós abate, visto que em um sistema de bicamada ou tricamada haveria a necessidade de repetir o processo mais de uma vez, onerando custos com materiais.

### Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [CAPES], Código do financiamento 001, Programa Nacional de Pós Doutorado [PNPD], Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia [FAPESB] e Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. [CNPq], Projeto 406375/2012-7.

### Referências

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. (2019). BeefREPORT: perfil da pecuária no Brasil. *Relatório anual* (48p.). Recuperado de <http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2018) *Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil*. Recuperado em 20 fevereiro, 2019, de <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta-o-Surtos-DTA-Fevereiro-2019.pdf>.

Cardoso, G. P., et al. (2016). Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. *Meat Science*, 114, 85-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.12.012>

Diniz, W. J. S., et al. (2012). Perfil do consumidor e sua percepção sobre os aspectos higiênicos da comercialização de carnes em feiras livres. *Acta Veterinaria Brasílica*, 6 (3), 223-229.

Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35 (6), 1039-1042. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>.

- Goy, R. C. & Assis, B. G. (2014). Antimicrobial analysis of films processed from chitosan and N,N,N-trimethylchitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31(3), 643-648, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00003014>
- Jones, D. S. & Medicott, N. J. (1995). Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation. *International Journal of Pharmaceutics*, 114 (2), 257-261. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(94\)00240-6](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00240-6)
- Karaman, I., et al. (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 85 (2-3), 231-235. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00006-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00006-0)
- Malinowska-Pañczyk, E. et al. (2015). Antimicrobial properties of chitosan solutions, chitosan films and gelatin-chitosan films. *Polimery*, (11-12), 735-741. DOI: <https://dx.doi.org/10.14314/polimery.2015.735>
- Oliveira, M. J., Araújo, W. M. C., & Borgo, L. A. (2005). Quantificação de nitrato e nitrito em lingüiças do tipo frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25 (4), 736-742. Recuperado de <https://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27644.pdf>
- Pinheiro, A. C., et al. (2010). Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. *Boletim de Biotecnologia*, 18-28.
- Rajoka, M., et al. (2020). Chitin/chitosan derivatives and their interactions with microorganisms: a comprehensive review and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40 (3), 365-379. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713719>
- Shekarforoush, S. S., Basiri, S., Ebrahimnejad, H., & Hosseinzadeh, S. (2015). Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 76, 303-309. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.033>
- Silva, N., et al. (2010). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água* (4 ed., 624p). São Paulo: Varela.
- Ye, M., Neetoo, H., & Chen, H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology*, 25 (2), 260-268. DOI: <https://doi:10.1016/j.fm.2007.10.014>

Recebido em: 18/10/2019

Aceito em 11/07/2020